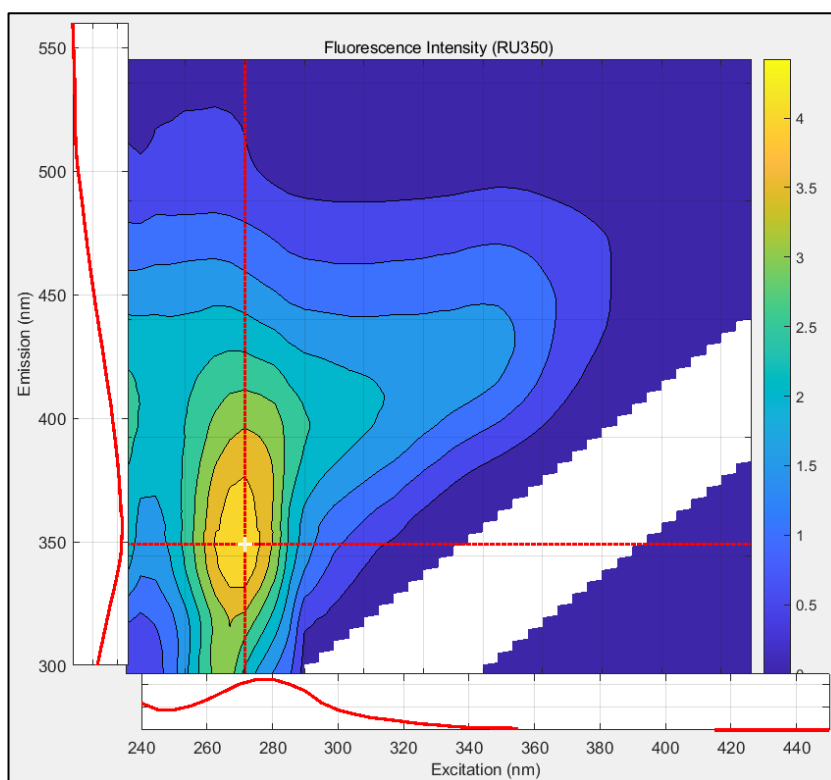




Uso de herramientas quimiométricas para evaluar episodios de contaminación: aplicación a aguas residuales urbanas



Marta Estrade Sánchez

Trabajo Fin de Grado

15 de junio de 2021

Doble grado en Ciencias Ambientales y Ciencias del Mar

Curso 20/21

Tutores: Enrique Nebot Sanz y Javier Moreno Andrés (Dpto. Tecnologías del Medio Ambiente)

“Cuando estás inspirado por algún gran propósito,
por algún proyecto extraordinario,
los pensamientos rompen sus barreras;
la mente trasciende sus limitaciones,
la conciencia se expande en todas direcciones,
y te encuentras en un mundo nuevo y maravilloso.
Las fuerzas, las facultades y los talentos dormidos cobran vida
y te das cuenta de que eres mucho más grande
de lo que jamás hubieras soñado”

Patañjali

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo ha sido elaborado en el marco del proyecto de innovación y mejora docente con referencia sol-202000162246-tra, el cual fue realizado en el departamento de Tecnologías del Medio Ambiente de la Universidad de Cádiz.

En primer lugar, agradecer a mis tutores Enrique Nebot Sanz y Javier Moreno Andrés por elegirme y confiar en mí para realizar este trabajo, sin su oportunidad, esfuerzo y dedicación nada de lo que está aquí escrito hubiera sido posible. Gracias por vuestra amabilidad, paciencia, ayuda y atención dedicada, me llevo un gran recuerdo y aprendizaje de este trabajo.

A Sara García Ballesteros de la Universidad Politécnica de Valencia (Campus de Alcoy) por enseñarme todos sus conocimientos de la aplicación EEMlab y por el gran favor que me hizo con las muestras.

A Jesús Forja Pajares del Departamento de Química-Física por prestarnos el espectrofluorímetro para la realización de las medidas, y al departamento de Física por la recogida de muestras en el Bajo de la Cabezuela.

Por otro lado, darles las gracias a mis padres Ramón y M^a Magdalena y a mi hermano Daniel, por apoyarme en cada paso durante estos años pese a las dificultades que nos encontramos por el camino. Gracias por haberme dado fuerzas en los momentos en los que ya no podía, por creer en mí y por vuestros ánimos, si hoy estoy aquí es gracias a vosotros.

A mis abuelos, por su amor incondicional, su ánimo y su ayuda, tanto en esta etapa como durante toda mi vida.

A mi pareja, Adrián, por su apoyo en todo lo que hago, por estar a mi lado tanto en los buenos momentos como en los más difíciles, y por ayudarme a ver siempre el lado bueno de las cosas, animándome a seguir adelante. Gracias por ser tú.

A mis amigas Celia y Andrea, por estar apoyándome desde el inicio de la carrera, por alegrarse y celebrar conmigo todo lo que he conseguido.

Por último, pero no por ello menos importante, agradecerles a Elisabet, Francisco, Ignacio, Manuel y Paloma, todos los momentos que hemos pasado juntos tanto en la universidad como fuera de ella.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	1
RESUMEN.....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	4
1.1. Aguas residuales urbanas (ARUs)	4
1.2. Estaciones depuradoras de aguas residuales (EDARs).....	5
1.3. Legislación	7
1.4. Contaminación del agua	10
1.5. Materia orgánica disuelta (MOD) en aguas residuales urbanas.....	11
1.6. Caracterización de MOD en aguas residuales	12
2. CARACTERÍSTICAS DE LAS EDARS OBJETO DE ESTUDIO.....	12
2.1. EDAR El Trocadero (Puerto Real).....	13
2.2. EDAR Guadalete (Jerez de la Frontera).....	14
2.3. EDAR El Torno (Chiclana de la Frontera).....	15
3. OBJETIVOS.....	18
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
4.1. Toma de muestras en EDARs y puntos de vertido.....	19
4.2. Técnicas analíticas y equipos.....	21
4.3. Análisis de factores paralelos (PARAFAC) para analizar matrices de excitación-emisión (EEMs) de fluorescencia	25
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
5.1. Evaluación de los parámetros medidos	31
5.2. Resultados EEM-PARAFAC	36
6. CONCLUSIONES.....	51
7. BIBLIOGRAFÍA.....	53
ANEXOS	61

LISTA DE ABREVIATURAS

ACP: Análisis de Componentes Principales

ARU: Agua Residual Urbana

CI: Cromatógrafo Iónico

COD: Carbono Orgánico Disuelto

COT: Carbono Orgánico Total

DBO₅: Demanda Bioquímica de Oxígeno a los 5 días

DQO: Demanda Química de Oxígeno

drEEM: decomposition routines for Excitation-Emission Matrices (Rutinas de descomposición para matrices de emisión de excitación)

DTO: Demanda Total de Oxígeno

EDAR: Estación Depuradora de Aguas Residuales

EEM: Excitation-Emission Matrix (matriz de excitación-emisión)

GUI: graphical user interface (interfaz gráfica de usuario)

h-e: habitante equivalente

IFE: Inner Filter Effect (efecto de filtro interno)

MO: Materia Orgánica

MOD: Materia Orgánica Disuelta

MODC: Materia Orgánica Disuelta Coloreada

MODF: Materia Orgánica Disuelta Fluorescente

NPOC: Non-Purgeable Organic Carbon (carbono orgánico no purgable)

NT: Nitrógeno Total

PARAFAC: PARAllel FACtor analysis (análisis de factores paralelos)

SS: Sólidos en Suspensión

SSE: Sum of Squared Error (suma de errores cuadrados)

RESUMEN

La caracterización de la materia orgánica disuelta (MOD) presente en las aguas residuales urbanas (ARUs), tanto a lo largo del sistema de depuración como en la zona de vertido, es importante para evaluar si el tratamiento de depuración se está realizando correctamente y para determinar si los efluentes pueden generar algún episodio de contaminación en las aguas naturales. El objetivo general de este trabajo fue estudiar y caracterizar la evolución de la MOD presente en las diferentes etapas de tratamiento de tres Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDARs) de la provincia de Cádiz y en sus posteriores vertidos, mediante matrices de excitación-emisión (EEMs) de fluorescencia junto con el análisis PARAFAC (EEM-PARAFAC). Tras este análisis, se obtuvieron entre cuatro y seis componentes específicos para las EDARs El Trocadero, Guadalete y El Torno. En la EDAR El Trocadero tres componentes se han relacionado con picos similares a las proteínas y otros tres con picos similares a los compuestos húmicos, mientras que en las EDARs Guadalete y El Torno un componente se ha relacionado con picos proteicos y otros tres con picos asociados a sustancias húmicas, sugiriendo una similar eficacia de depuración. En estas EDARs (Guadalete y El Torno), los tratamientos secundario y terciario redujeron la concentración de los componentes con picos proteicos (asociados a aguas sin depurar) una media de un 36.16%, sin embargo, aumentaron la concentración de los componentes húmicos (asociados a aguas depuradas) un 40.80%. Los componentes asociados al pico Trp1 (triptófano) predominan en las ARUs brutas, por lo que sirven como indicador de la eficacia del tratamiento de depuración. Por otro lado, en aguas depuradas o no contaminadas predominan los picos similares a los húmicos; este hecho podría constituir una característica específica para identificar aguas contaminadas por vertidos de ARUs. El pico Trp2, detectado únicamente en la EDAR El Trocadero y asociado a un vertido anómalo, demuestra la eficacia de EEM-PARAFAC para identificar componentes extraños en las ARUs y prevenir su impacto sobre el medio receptor.

Como conclusión se puede establecer que EEM-PARAFAC es una metodología apropiada para caracterizar y realizar el seguimiento de la MOD a lo largo del sistema de depuración de ARUs y en la zona de vertido, constituyendo una herramienta útil para la gestión de las EDARs.

Palabras claves: EEMlab, PARAFAC, EEMs, fluorescencia, MOD, aguas residuales urbanas.

ABSTRACT

Characterization of dissolved organic matter (DOM) present in urban wastewater, both throughout the treatment system and in the discharge zone, it is important to evaluate if the treatment is being carried out correctly and to determine if effluents can generate an episode of pollution in natural waters. The general aim of this work was to study and characterize the evolution of the DOM present in the different treatment stages of three Wastewater Treatment Plants (WWTPs) in the province of Cádiz and in their subsequent discharges, by excitation-emission matrices (EEMs) of fluorescence together with PARAFAC analysis (EEM-PARAFAC). After this analysis, between four and six specific components were obtained for the El Trocadero, Guadalete and El Torno WWTPs. In the El Trocadero WWTP three components have been associated with proteins-like peaks and another three with humic-like peaks compounds, while in the Guadalete and El Torno WWTPs one component has been associated with protein peaks and another three with associated to humic substances peaks, suggesting a similar purification efficiency. In these WWTPs (Guadalete and El Torno), secondary and tertiary treatments reduced the concentration of components with protein peaks (associated with raw water) by an average of 36.16%, however, they increased the concentration of humic components (associated to treated water) by 40.80%. The components associated with the Trp1 peak (tryptophan) predominate in raw urban wastewater, thus serving as an indicator of the efficacy of the purification treatment. On the other hand, in purified or uncontaminated waters, humic-like peaks predominate; this fact could constitute a specific characteristic to identify waters polluted by discharges of urban wastewater. The Trp2 peak, detected only at the El Trocadero WWTP and associated with an anomalous discharge, demonstrates the effectiveness of EEM-PARAFAC to identify foreign components in urban wastewater and prevent their impact on the receiving environment.

As a conclusion, it can be established that EEM-PARAFAC is an appropriate methodology to characterize and monitor the FDOM throughout the urban wastewater purification system and in the discharge zone, constituting a useful tool for the management of WWTPs.

Keywords: EEMlab, PARAFAC, EEMs, fluorescence, DOM, urban wastewater.

1. INTRODUCCIÓN

La contaminación ambiental es un importante problema mundial. En la actualidad, la atención está centrada especialmente en los cambios que genera esta contaminación en las características físicas, químicas y biológicas del aire, del agua y del suelo, debido a que acaban afectando a la salud humana y al resto de seres vivos y ecosistemas (Misra y Mani, 2009).

Las actividades humanas tanto cotidianas como industriales generan aguas residuales, es una consecuencia inevitable. Estas actividades provocan una modificación de las características del agua, contaminándola, alterando su calidad e invalidando su aplicación para otros posibles usos.

Una parte importante de la contaminación ambiental que está afectando a nuestros ecosistemas acuáticos se debe al vertido de aguas residuales mal depuradas e, incluso, sin depurar; lo que se debe al insuficiente tratamiento de depuración de estas aguas en las Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDARs).

1.1. Aguas residuales urbanas (ARUs)

El Real Decreto-ley 11/95 del 28 de diciembre, que transpone a la Directiva 91/271/CEE sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas, establece las siguientes definiciones:

- Aguas residuales urbanas: las aguas residuales domésticas o la mezcla de éstas con aguas residuales industriales o con aguas de escorrentía pluvial.
- Aguas residuales domésticas: las aguas residuales procedentes de zonas de vivienda y de servicios, generadas principalmente por el metabolismo humano y las actividades domésticas.
- Aguas residuales industriales: todas las aguas residuales vertidas desde locales utilizados para cualquier actividad comercial o industrial, que no sean aguas residuales domésticas ni aguas de escorrentía pluvial.

Las aguas residuales urbanas (ARUs) están compuestas por una mezcla compleja, tanto de materia orgánica como inorgánica, y que contiene diversos micro y macroorganismos, convirtiéndose en un vehículo perfecto para la dispersión de compuestos que son peligrosos tanto para la salud humana como para el medio ambiente. Algunos efectos de la contaminación del agua pueden reconocerse inmediatamente, pero hay otros que no aparecen hasta pasados unos meses o incluso años (Ashraf et al, 2010), por lo que es

importante realizar un control o seguimiento sobre el tratamiento de depuración y el posterior vertido de estas aguas.

1.2. Estaciones depuradoras de aguas residuales (EDARs)

La estación depuradora de aguas residuales (EDAR) es una planta de tratamiento que se encarga de la depuración de las aguas residuales que provienen de una población y/o de una industria; una vez tratada esa agua, reduciendo la contaminación mediante diversos tratamientos físicos, químicos y biológicos de depuración, se vierte por el efluente a la zona de vertido.

El objetivo de las EDARs es disminuir, a través de los tratamientos de depuración, la contaminación de las ARUs para que su vertido sea asimilable por el medio acuático receptor o que se pueda reutilizar para la agricultura, industrias u otros fines.

Dentro de la línea de aguas de una EDAR, las etapas de tratamiento se reflejan, de forma resumida, en la [Figura 1](#).

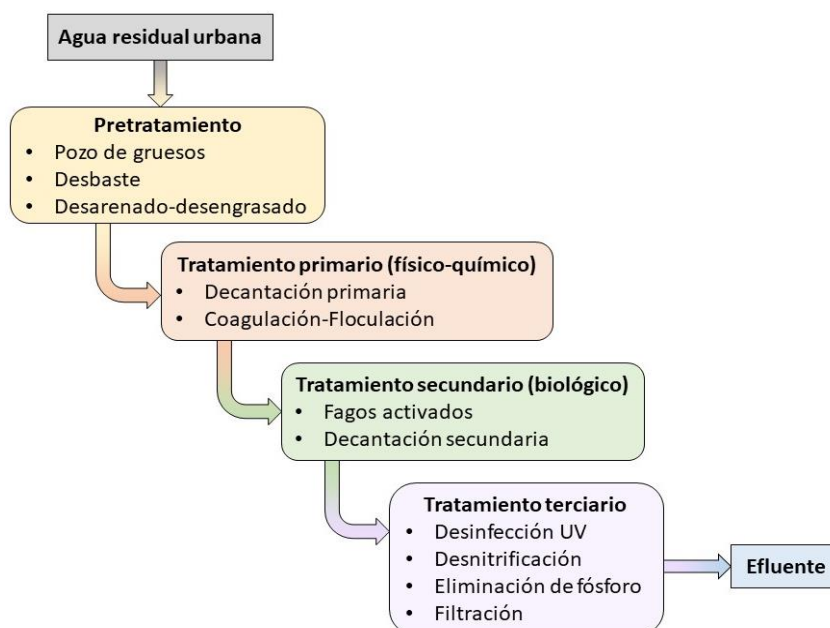


Figura 1 Esquema de la línea de aguas del tratamiento de aguas residuales urbanas en una EDAR
Fuente: elaboración propia

En España, la línea de aguas de la mayoría de las EDARs está constituida por un tratamiento primario y un tratamiento secundario, sin embargo, se ha demostrado que la implementación de tratamientos terciarios para el tratamiento de las ARUs provoca una mejor eliminación de compuestos y depuración de estas aguas (González et al, 2007; Radjenovic et al, 2007).

El Real Decreto-ley 11/95 del 28 de diciembre, que transpone a la Directiva 91/271/CEE sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas, define el tratamiento adecuado como: “El tratamiento de las aguas residuales urbanas mediante cualquier proceso o sistema de eliminación, en virtud del cual las aguas receptoras cumplan después del vertido los objetivos de calidad previstos en el ordenamiento jurídico aplicable”.

Las ARUs, cuando llegan a las EDARs, se someten a las diferentes etapas de tratamiento, pero si no reciben el tratamiento adecuado pueden llegar a ser perjudiciales para el medio al que se vierten. Un tratamiento inadecuado de las ARUs puede deberse a diferentes factores:

- Numerosas EDARs fueron construidas a finales del siglo pasado para un caudal de entrada muy inferior al de la actualidad, ya que debido al aumento de la población y a la actividad antrópica se produce un aumento de caudal de las aguas residuales y de su nivel de contaminación, esto conlleva a que muchas de estas depuradoras se hayan ido quedando obsoletas por no poder asimilar la carga contaminante y, consecuentemente, no cumplir con la normativa de vertido.
- En muchas EDARs no se contempla el fenómeno de estacionalidad del turismo en las zonas costeras, el cual hace duplicar, e incluso triplicar, la población en la época estival. Este aumento de la población en verano aumenta el caudal de entrada de agua en la depuradora y, al no estar estas EDARs adaptadas a un caudal mayor, las etapas de tratamiento no cumplen su función correctamente, provocando que la carga contaminante aumente en el efluente y, posteriormente, en la zona de vertido.
- En la mayoría de los colectores municipales no existe separación de aguas pluviales, esto hace que cuando se producen lluvias torrenciales éstas se mezclan con las aguas que recibe la depuradora, y se vierten sin depurar a través de los aliviaderos. Esta falta de instalaciones para la separación de aguas pluviales de las ARUs provoca un aumento de vertido al medio sin tratamiento de depuración.
- En los países menos desarrollados las ARUs no son sometidas a tratamientos adecuados y son vertidas con carga contaminante. A escala mundial, más del 80% de estas aguas son vertidas sin tratar (UNESCO, 2017).

Estos problemas son un indicativo de que hay que reformar muchas EDARs, para que cumplan la normativa y no se realicen vertidos que puedan generar efectos nocivos en el medio.

1.3. Legislación

La normativa vigente con respecto al agua y su tratamiento se encuentra dividida entre diferentes competencias: normativa europea (directivas), normativa nacional (reales decretos y leyes) y normativa autonómica (decretos legislativos).

1.3.1. Normativa europea

Las directivas europeas directamente relacionadas con las ARUs pueden resumirse en:

- Directiva 91/271/CEE, de 21 de mayo de 1991, sobre el tratamiento de aguas residuales urbanas, que establece las medidas necesarias para garantizar que estas aguas reciben un tratamiento adecuado antes de su vertido, protegiendo así al medio ambiente de los efectos negativos de estos vertidos.
- Directiva 98/15/CE, de 27 de febrero de 1998, que modifica a la anterior Directiva 91/271/CEE, y por la cual definen los sistemas de recogida, tratamiento y vertido de las aguas residuales urbanas.
- Directiva 2000/60/CE, de 23 octubre de 2000 (Directiva Marco del Agua), que establece el marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas. Esta directiva regula la gestión de las aguas superficiales continentales, las aguas de transición, las aguas costeras y las aguas subterráneas, teniendo como objetivos prevenir, reducir la contaminación, promocionar el uso sostenible del agua, proteger el medio ambiente, mejorar la situación de los ecosistemas acuáticos, y atenuar los efectos de las inundaciones y de las sequías.

1.3.2. Normativa estatal

- Real Decreto-Ley 11/1995: La Directiva 91/271/CEE ha sido transpuesta a la normativa española por el Real Decreto-Ley 11/1995 del 28 de diciembre de 1995 por el que se establecen las normas aplicables al tratamiento de las aguas residuales urbanas, para proteger la calidad de las aguas continentales y marítimas de los efectos negativos de los vertidos de estas aguas.
- Real Decreto 509/1996, de 15 de marzo de 1996, que desarrolla el Real Decreto-Ley 11/1995 completando las normas sobre la recogida, depuración y vertido de las aguas residuales urbanas.
- Real Decreto 817/2015, de 11 de septiembre de 2015, por el que se establecen los criterios de seguimiento y evaluación del estado de las aguas superficiales y las normas de calidad ambiental.

1.3.3. Normativa autonómica andaluza

- Decreto 204/2005, de 27 de septiembre de 2005, por el que se declaran las zonas sensibles y normales en las aguas de transición y costeras y de las cuencas hidrográficas intracomunitarias gestionadas por la Comunidad Autónoma de Andalucía.
- Decreto 109/2015, de 17 de marzo de 2015, por el que se aprueba el Reglamento de Vertidos al Dominio Público Hidráulico y al Dominio Público Marítimo-Terrestre de Andalucía.

1.3.4. Control de vertidos

Según la Directiva 91/271/CEE del 21 de mayo de 1991, en función de la zona en la que se realice el vertido y del número de habitantes equivalentes (h-e), se debe realizar un tipo de tratamiento u otro ([Tabla 1](#)). Para tal fin, el artículo 2.d del Real Decreto-ley 11/1995, define un habitante equivalente (h-e) como la carga orgánica biodegradable con una Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO₅) de 60 g O₂/(hab·d). Este valor se calcula a partir del valor medio diario de carga orgánica biodegradable, correspondiente a la semana de máxima carga del año, sin tener en cuenta las situaciones producidas por lluvias intensas u otras circunstancias excepcionales (artículo 4 del RD 509/1996).

Tabla 1 Requerimientos de los tipos de tratamiento de depuración de aguas residuales urbanas según la directiva 91/271/CEE

Fuente: tomado y adaptado del Manual para la gestión de vertidos del MITECO

ZONAS		HABITANTES EQUIVALENTES (h-e)				
		0 – 2.000	2.000 – 10.000	10.000 – 15.000	15.000 – 150.000	> 150.000
NORMALES	Aguas dulces y estuarios	Tratamiento adecuado Art. 7	Tratamiento secundario Art. 4.1	Tratamiento secundario Art. 4.1	Tratamiento secundario Art. 4.1	Tratamiento secundario Art. 4.1
	Aguas costeras	Tratamiento adecuado Art. 7	Tratamiento adecuado Art. 7	Tratamiento secundario Art. 4.1	Tratamiento secundario Art. 4.1	Tratamiento secundario Art. 4.1
SENSIBLES	Aguas dulces y estuarios	Tratamiento adecuado Art. 7	Tratamiento secundario Art. 4.1	Tratamiento más riguroso (1) Art. 5.2	Tratamiento más riguroso (1) Art. 5.2	Tratamiento más riguroso (1) Art. 5.2
	Aguas costeras	Tratamiento adecuado Art. 7	Tratamiento adecuado Art. 7	Tratamiento más riguroso Art. 5.2	Tratamiento más riguroso Art. 5.2	Tratamiento más riguroso Art. 5.2
MENOS SENSIBLES	Estuarios	Tratamiento adecuado Art. 7	Tratamiento menos riguroso* Art. 6.2	Tratamiento secundario Art. 4.1	Tratamiento secundario Art. 4.1	Tratamiento secundario Art. 4.1
	Aguas costeras	Tratamiento adecuado Art. 7	Tratamiento adecuado Art. 7	Tratamiento menos riguroso* Art. 6.2	Tratamiento menos riguroso* Art. 6.2	Tratamiento secundario Art. 4.1

(1) Zonas de alta montaña > 1.500 m de altitud. Tratamiento secundario menos riguroso para DBO₅ y SS incluso en caso de requerir tratamiento más riguroso para N y/o P.

* Deben recibir al menos un tratamiento primario.

Así mismo, en virtud del artículo 24.9 del Decreto 109/2015 del 17 de marzo de 2015, por el que se aprueba el Reglamento de Vertidos al Dominio Público Hidráulico y al Dominio Público Marítimo-Terrestre de Andalucía, los vertidos procedentes de las instalaciones de tratamiento de aguas residuales urbanas deberán cumplir los requisitos que se establecen en el Anexo I del Real Decreto 509/1996 del 15 de marzo de 1996, por el que se establecen los requisitos de calidad para el vertido de estas aguas aplicando el valor de concentración y el porcentaje de reducción para los parámetros de demanda bioquímica de oxígeno a los 5 días (DBO₅), demanda química de oxígeno (DQO), sólidos en suspensión (SS) ([Tabla 2](#)) y nutrientes en forma de fósforo y nitrógeno ([Tabla 3](#)); estos dos últimos sólo son exigidos para zonas sensibles.

Tabla 2 Requisitos para los vertidos procedentes de las instalaciones de depuración de aguas residuales urbanas mediante tratamiento secundario (a)

Fuente: tomado y adaptado del Manual para la gestión de vertidos del MITECO

Parámetros	Concentración	Porcentaje mínimo de reducción (b)
Demanda bioquímica de oxígeno (DBO ₅) (c)	25 mg O ₂ /L	70 – 90 %
Demanda química de oxígeno (DQO)	125 mg O ₂ /L	75 %
Sólidos en suspensión (SS)	35 mg/L (d)	90 % (d)

- (a) O proceso equivalente. Se aplicará el valor de concentración o el porcentaje de reducción.
- (b) Reducción relacionada con la carga del caudal de entrada.
- (c) Este parámetro puede sustituirse por otro: carbono orgánico total (COT) o demanda total de oxígeno (DTO), si puede establecerse una correlación entre la DBO₅ y el parámetro sustituto.
- (d) Este requisito es optativo. Los análisis de vertidos procedentes de sistemas de depuración por lagunaje se llevarán a cabo sobre muestras filtradas; no obstante, la concentración de sólidos en suspensión en las muestras de agua sin filtrar no deberá superar los 150 mg/L.

Tabla 3 Requisitos para los vertidos procedentes de las instalaciones de depuración de aguas residuales urbanas realizados en zonas sensibles (a)

Fuente: tomado y adaptado del Manual para la gestión de vertidos del MITECO

Parámetros	Concentración		Porcentaje mínimo de reducción (b)
	10.000 a 100.000 h-e	> 100.000 h-e	
Fósforo total	2 mg/L P	1 mg/L P	80 %
Nitrógeno total (c) (mg/L N)	15 mg/L N (d)	10 mg/L N	70 – 80 %

- (a) Según la situación local se podrá aplicar uno o los dos parámetros. Se aplicará el valor de concentración o el porcentaje de reducción.
- (b) Reducción relacionada con la carga del caudal de entrada.
- (c) Nitrógeno total equivalente a la suma del nitrógeno Kjeldahl total (N orgánico y amoniacal), nitrógeno en forma de nitrato (NO₃) y nitrógeno en forma de nitrito (NO₂).
- (d) Estos valores de concentración constituyen medias anuales según el punto 3º del apartado A) 2 del Anexo III del RD. 509/1996. No obstante, los requisitos relativos al nitrógeno pueden comprobarse mediante medias diarias cuando se demuestre, que de conformidad con el apartado A)1 del Anexo III, se obtiene el mismo nivel de protección. En ese caso la media diaria no deberá superar los 20 mg/l de Nitrógeno total para todas las muestras, cuando la temperatura del efluente del reactor biológico sea superior o igual a 12 ° C. En sustitución del requisito relativo a la temperatura, se podrá aplicar una limitación del tiempo de funcionamiento que tenga en cuenta las condiciones climáticas regionales.

1.4. Contaminación del agua

La contaminación se define en el artículo 93 del Real Decreto Legislativo 1/2001 del 20 de julio, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Aguas de la siguiente forma:

“Se entiende por contaminación, a los efectos de esta ley, la acción y el efecto de introducir materias o formas de energía, o inducir condiciones en el agua que, de modo directo o indirecto, impliquen una alteración perjudicial de su calidad en relación con los usos posteriores, con la salud humana, o con los ecosistemas acuáticos o terrestres directamente asociados a los acuáticos; causen daños a los bienes; y deterioren o dificulten el disfrute y los usos del medio ambiente”.

Es decir, cualquier cambio físico, químico o biológico que se produzca en el agua natural y produzca efectos nocivos sobre el ser humano o los sistemas acuáticos, se considera contaminación. Por ello, es importante conocer la composición de las ARUs para saber qué contaminantes hay que eliminar a lo largo del proceso de depuración, y asegurar que éstos no generen episodios de contaminación en la zona de vertido.

Las medidas legislativas desarrolladas en el [apartado 1.3](#) son las que se han establecido para evitar la contaminación del agua por los vertidos de las EDARs, con unos límites de concentración (o porcentaje de depuración) para los parámetros de DBO₅, DQO, SS, nitrógeno y fósforo, los cuales no deben sobrepasarse en el efluente de la depuradora. Si sobrepasa estos límites se estaría contaminando la zona de vertido e incumpliendo la normativa.

Si el agua no está depurada correctamente y se vierte al medio se generan efectos nocivos en la zona de vertido, como ejemplos de contaminación provocada por este vertido podemos destacar (Dewisme, 1997; Matia et al., 1999):

- Los SS aumentan la turbidez del agua, impidiendo la entrada de luz y con ello la fotosíntesis, reduciendo así la producción de O₂. También pueden ser un vector de contaminación debido a que los organismos patógenos se pueden adherir a los sólidos.
- Los cambios de conductividad pueden impedir la supervivencia de diversas especies de flora y fauna.
- El aumento de nutrientes provoca la eutrofización del agua debido al aumento de la producción primaria. El crecimiento de algas provoca un mayor consumo de oxígeno, pudiendo generar condiciones anóxicas en el medio.

- El aumento de la materia orgánica (MO) aumenta la actividad microbiana provocando una reducción de los niveles de oxígeno en el medio.
- Aumento de microorganismos patógenos y de microcontaminantes que son tóxicos para la vida acuática y para el ser humano.

1.5. Materia orgánica disuelta (MOD) en aguas residuales urbanas

La materia orgánica disuelta (MOD) es un componente clave en todos los sistemas acuáticos, debido a que es una de las principales fuentes de carbono orgánico y a que está implicada en los ciclos biogeoquímicos (C, N y P) (Findlay y Sinsabaugh, 2003).

En algunas EDARs, las ARUs, incluso después de los tratamientos de depuración, pueden contener una considerable carga de MOD y contaminantes tanto orgánicos como inorgánicos perjudiciales para los sistemas acuáticos (Baker, 2002; Janhom et al., 2009; Lee et al., 2014). El vertido de estas ARUs puede provocar diversos problemas ambientales en las masas de agua receptoras (río, mar, etc.), tales como eutrofización, hipoxia y toxicidad (Eckenfelder, 2000; Yang et al., 2015).

Para cuantificar la MOD de las ARUs se pueden utilizar los parámetros indicadores como la DBO₅, DQO o Carbono Orgánico Total (COT), pero éstos no proporcionan información sobre la composición estructural de la materia orgánica. Una técnica que está adquiriendo interés científico en los últimos años es el análisis de matrices de excitación-emisión (EEMs) de fluorescencia, que permite caracterizar la MOD en agua sin procedimientos analíticos laboriosos (Kalbitz et al., 2000).

En diversos estudios, se ha medido la fluorescencia de la MOD en diferentes aguas (naturales, residuales, estuarios, etc.) para identificar sus distintas fracciones, y se ha estimado que entre el 20% y el 70% del carbono orgánico disuelto (COD) se encuentra como materia orgánica disuelta coloreada (MODC) (Lanne y Koole, 1982), y dentro de ésta se aparece la materia orgánica disuelta fluorescente (MODF), la cual puede dividir en MODF_A (aminoácidos o proteínas) y en MODF_H (húmicos) (Coble, 2007).

Más concretamente, estudios anteriores que se han realizado para evaluar y comprender las características de MOD han revelado que los ríos urbanizados han sufrido grandes cambios como resultado del aporte antropogénico (Baker, 2001; Felipe-Sotelo et al., 2007; Mostofa et al., 2010; Kaushal et al., 2011; Petrone et al., 2011; Osburn et al., 2012).

Por lo tanto, identificar y caracterizar la MODF en las EDARs puede ser útil para evaluar si los tratamientos de depuración de las ARUs se están realizando correctamente y si se produce algún efecto adverso al ingresar estas aguas en los sistemas acuáticos.

1.6. Caracterización de MOD en aguas residuales

Las EEMs contienen mucha información, pero no es fácil analizarla. Existen diferentes técnicas quimiométricas para evaluar las EEMs de aguas residuales como, por ejemplo, el análisis de componentes principales (ACP) (Tartakovsky et al., 1996) o la regresión de mínimos cuadrados parciales (Vasel y Praet, 2002).

La matriz de excitación-emisión de fluorescencia combinada con el análisis de factores paralelos (EEM-PARAFAC) es otra de las técnicas quimiométricas que se aplica para la caracterización de la MOD en ecosistemas acuáticos (por ejemplo, Henderson et al., 2009; Khamis et al., 2015; Rodríguez-Vidal et al., 2020; Amaral et al., 2020).

Numerosos estudios han demostrado que existen fluoróforos específicos que se pueden asociar con algunos compuestos de la MOD (por ejemplo, Coble et al., 1998; Peiris et al., 2011; Yu et al., 2013; Rodríguez-Vidal et al., 2020). Aunque no es posible identificar compuestos específicos, sí se pueden relacionar las diferentes fracciones de la MOD con compuestos similares a aminoácidos, ácidos húmicos, fúlvicos, etc. (Henderson et al., 2009; Rodríguez-Vidal et al., 2020), pudiendo caracterizar así la MOD que aparece en el agua residual.

2. CARACTERÍSTICAS DE LAS EDARS OBJETO DE ESTUDIO

En este estudio se han escogido tres EDARs de la provincia de Cádiz con distintos tratamientos de depuración y que vierten en distintos ecosistemas, con el fin de analizar distintos escenarios en base a su proceso de tratamiento y ecosistema receptor:

- EDAR El Trocadero: sólo dispone de tratamiento primario y secundario, su vertido se realiza a una zona costera y portuaria, y recibe vertidos de dos polígonos industriales.
- EDAR Guadalete: dispone de tratamiento primario y secundario (el tratamiento terciario sólo se aplica a un pequeño porcentaje del caudal total), su vertido se realiza a un río de agua dulce, y es la EDAR con mayor volumen de caudal de entrada de la provincia.

- EDAR El Torno: dispone de tratamiento primario, secundario y terciario, y su vertido se realiza a un río fuertemente influenciado por el régimen mareal.

2.1. EDAR El Trocadero (Puerto Real)

La EDAR El Trocadero ([Figura 2](#)), ubicada en la localidad de Puerto Real (Cádiz), se construyó y empezó su funcionamiento en el año 1987, está pendiente de ser demolida y construida una nueva por su antigüedad y porque no cumple la normativa (Directiva 91/271/CEE), debido a que vierte a una zona sensible (Decreto 204/2005 del 27 de septiembre) y no dispone de instalaciones para la eliminación de nitrógeno y fósforo.



Figura 2 EDAR El Trocadero
Fuente: Google Earth Pro

La depuradora tiene un caudal de entrada de 45.249 h-e y una población de diseño de 60.000 h-e. Esta depuradora se encarga de tratar las aguas residuales que provienen de Puerto Real, de los polígonos industriales de El Trocadero y Río San Pedro, y de las barriadas rurales.

Una parte pequeña del agua tratada se utiliza para riego de la propia parcela, y el resto del vertido se realiza en el Bajo de la Cabezuela (Latitud: 36.52306788298313 / Longitud: -6.256920311737941) con un emisario submarino, cuya ubicación es una zona sensible. El volumen anual total de vertido es de 2.969.000 m³ (Autorización de vertido EDAR El Trocadero, expediente: AAU/CA/024/19).

En virtud de lo establecido en la [Tabla 1](#), la EDAR El Trocadero debe realizar un tratamiento más riguroso, es decir, un tratamiento terciario que incluya la eliminación de nitrógeno y fósforo hasta los límites requeridos.

Tratamientos de depuración

En la EDAR El Trocadero se pueden distinguir dos líneas de procesos:

1. **Línea de agua:** pretratamiento, tratamiento físico-químico (tratamiento primario, si hay una elevada carga contaminante), decantación primaria, tratamiento biológico (tratamiento secundario), y decantación secundaria.
2. **Línea de fangos:** espesamiento (tanto de los lodos primarios como de los secundarios), deshidratación, y evacuación (se llevan a la planta valorización para su compostaje y posterior aprovechamiento en agricultura).

2.2. EDAR Guadalete (Jerez de la Frontera)

La EDAR Guadalete ([Figura 3](#)), ubicada en el polígono industrial de “El Portal” en la localidad de Jerez de la Frontera (Cádiz), se construyó y empezó su funcionamiento en el año 1994.



*Figura 3 EDAR Guadalete y punto de vertido
Fuente: Google Earth Pro*

La depuradora tiene un caudal de entrada de 274.946 h-e y una población de diseño de 864.000 h-e. Existen dos sistemas colectores que se encargan de que todos los efluentes de la ciudad y zonas aledañas lleguen a la depuradora. Durante la época de vendimia (dos

meses) se aporta a la depuradora mayor carga contaminante, esto fue lo que condicionó el sobredimensionamiento de las instalaciones.

El agua tratada se utiliza para el riego de zonas verdes, un campo de golf y equipamientos, el resto del vertido se realiza al río Guadalete (Latitud: 36.64040717194553 / Longitud: -6.1293354353226235), cuya ubicación es una zona normal. El volumen anual total de vertido es de 18.000.000 m³ (Autorización de vertido EDAR Guadalete, expediente: AY0030/CA-1488).

En virtud de lo establecido en la [Tabla 1](#), la EDAR Guadalete debe realizar un tratamiento secundario.

Tratamientos de depuración

En la EDAR Guadalete se pueden distinguir tres líneas de procesos:

1. **Línea de agua:** pretratamiento, tratamiento físico-químico (tratamiento primario), decantación primaria, tratamiento biológico (tratamiento secundario), decantación secundaria, y tratamiento terciario (filtración y desinfección ultravioleta).
2. **Línea de fangos:** espesamiento (tanto de los lodos primarios como de los secundarios), estabilización anaerobia mesofílica de fangos (agitados con biogás), deshidratación, y evacuación (se llevan a la planta de compostaje para su posterior aplicación en agricultura).
3. **Línea de gas:** el biogás producido por los digestores es conducido, almacenado y manipulado durante esta línea. El proyecto *SMART Green Gas* de Aqualia se ha desarrollado para convertir parte del gas que se genera en biocombustible renovable (biometano) para coches de gas natural comprimido.

2.3. EDAR El Torno (Chiclana de la Frontera)

La EDAR El Torno ([Figura 4](#)), ubicada en el Parque Periurbano Las Albinas en polígono industrial “El Torno” en la localidad de Chiclana de la Frontera (Cádiz), se construyó en el año 1986 y se reformó en el año 1996.



Figura 4 EDAR El Torno y punto de vertido
Fuente: Google Earth Pro

La depuradora tiene un caudal de entrada de 72.726 h-e y una población de diseño de 90.000 h-e. Esta depuradora se encarga de tratar las aguas residuales que provienen del casco urbano de Chiclana de la Frontera a través de la estación de bombeo Virgen del Carmen.

El agua tratada se utiliza para riego de zonas verdes, áreas agrícolas y campos de golf, lo que supone un porcentaje de reutilización del 31'5% de los vertidos que llegan a la EDAR, el resto del vertido se realiza en el río Iro (Latitud: 36.4273798916805 / Longitud: - 6.157085559820771), cuya ubicación es una zona sensible. El volumen anual total de vertido es de 3.855.000 m³ (Autorización de vertido EDAR El Torno, expediente: AV-CA 08/97).

En virtud de lo establecido en la [Tabla 1](#), la EDAR El Torno debe realizar un tratamiento más riguroso, es decir, un tratamiento terciario que incluya la eliminación de nitrógeno y fósforo hasta los límites requeridos.

Tratamientos de depuración

En la EDAR El Torno se pueden distinguir tres líneas de procesos:

1. **Línea de agua:** pretratamiento, decantación primaria (tratamiento primario), tratamiento biológico (tratamiento secundario), decantación secundaria, tratamiento terciario para una posible reutilización del agua depurada (tratamiento de desnitrificación y eliminación de fosforo, y desinfección por ultravioleta).

2. **Línea de fangos:** espesamiento (tanto de los lodos primarios como de los secundarios), digestión aerobia de lodos y deshidratación.
Posteriormente los fangos son gestionados por una empresa externa.
3. **Línea de aire:** sistema de desodorización mediante dos torres (ácida y alcalina-oxidante), se corrigen las emisiones durante el tratamiento de depuración.

La EDAR El Torno ha apostado por estrategias I+D+i en los últimos años, como muestra de ello es el proyecto *All-gas* de Aqualia, por el cual se obtiene biocombustible para coches de gas natural comprimido y otros productos de alto valor energético a partir del cultivo de microalgas con agua residual depurada, también contribuye a la mejora de los procesos de depuración. Las instalaciones destinadas al proyecto son de 2 hectáreas, esto supone una producción de biogás para impulsar a 40 coches. Este proyecto transforma el agua sucia (residuo) en materia prima con valor añadido de una manera sostenible, potenciando así la economía circular y siendo respetuoso con el medio ambiente.

3. OBJETIVOS

En base a lo anteriormente expuesto, se propone como objetivo general del presente Trabajo de Fin de Grado estudiar y caracterizar la evolución de la materia orgánica disuelta (MOD) presente en las diferentes etapas de tratamiento de tres Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDARs) y en sus posteriores vertidos, mediante el uso de herramientas quimiométricas, en concreto, EEM-PARAFAC. Se parte de la hipótesis de que con el análisis PARAFAC, se podrá obtener una información más completa sobre la caracterización de la MOD, tanto en el sistema de depuración como en la zona de vertido.

Para alcanzar dicho objetivo se establecen los siguientes objetivos específicos:

- Caracterizar las aguas residuales urbanas de las EDARs a través de los parámetros establecidos en el Real Decreto 509/1996 y con otros parámetros de interés para el estudio (pH, conductividad, carbono orgánico disuelto, iones, etc.).
- Obtener, analizar y estudiar las distintas EEMs de fluorescencia procedente de las muestras de aguas residuales urbanas mediante el análisis PARAFAC (PARAllel FACtor analysis), utilizando la aplicación EEMlab.
- Tratar los datos obtenidos y caracterizar a nivel estructural y funcional la MOD presente en las aguas residuales urbanas, tanto en las etapas del tratamiento de depuración de las EDARs como en el punto de vertido y en zonas aledañas de descarga.
- Evaluar el rendimiento de depuración de las distintas EDARs estudiando su capacidad de eliminación de MOD, y estudiar la evolución de la MOD en la zona de vertido.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Toma de muestras en EDARs y puntos de vertido

El estudio se realizó para las Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDARs) de “El Trocadero” en Puerto Real, “Guadalete” en Jerez de la Frontera, y “El Torno” en Chiclana de la Frontera, durante los meses de febrero, marzo, abril y mayo del año 2021.

Se realizaron dos muestreos para cada una de las tres depuradoras, donde se tomaron muestras a la entrada (pasando el desbaste), después del tratamiento primario, y a la salida de la EDAR. Además, se tomaron muestras en el medio receptor y en el punto de vertido. En la EDAR El Torno también se tomaron muestras entre el tratamiento secundario y el tratamiento terciario, debido a que esta depuradora es la única de las tres muestreadas que posee instalaciones para un tratamiento terciario.

4.1.1. EDAR El Trocadero (Puerto Real)

La primera toma de muestras en la EDAR El Trocadero se realizó el 17 de febrero de 2021, se tomaron 2 L de la entrada, 2 L del intermedio (entre el tratamiento primario y el tratamiento secundario), y 2 L de la salida.

La segunda toma de muestras se realizó el 16 de marzo de 2021, tomando los mismos volúmenes y en los mismos puntos anteriormente mencionados. Cabe destacar que, en este segundo muestreo, la muestra tomada relativa a la entrada mostraba un color rojizo, lo que no era común con respecto al funcionamiento rutinario de la EDAR.

El vertido se realiza a través de un emisario submarino en la zona portuaria del Bajo de la Cabezuela, las muestras se recogieron aprovechando que investigadores del departamento de física aplicada de la Universidad de Cádiz (UCA) estaban realizando muestreos en la zona con una embarcación.

4.1.2. EDAR Guadalete (Jerez de la Frontera)

La primera toma de muestras en la EDAR Guadalete se realizó el 9 de marzo de 2021, se tomaron 2 L de la entrada, 2 L del intermedio (entre el tratamiento primario y el tratamiento secundario), y 2 L de la salida.

La segunda toma de muestras se realizó el 6 de abril de 2021, tomando los mismos volúmenes y en los mismos puntos anteriormente mencionados.

Para la toma de muestras del vertido se realizaron tres muestreos como se puede observar en la [Figura 5](#):



*Figura 5 Puntos de muestreo EDAR Guadalete
Fuente: Google Earth Pro y elaboración propia*

- Punto de muestreo 1: el primero en la zona de vertido en el río (Latitud: 36.640469 / Longitud: -6.129426).
- Punto de muestreo 2: el segundo aguas abajo de la zona de vertido para observar la dilución del vertido (Latitud: 36.640106 / Longitud: -6.129691). El punto de muestreo 2 se encuentra a 46 metros del punto de muestreo 1.
- Punto de muestreo 3: el tercero aguas arriba de la zona de vertido para tener un valor de referencia (Latitud: 36.641022 / Longitud: -6.128422). El punto de muestreo 3 se encuentra a 100 metros del punto de muestreo 1. La contaminación que se puede observar en este punto se encontraba por toda la zona alrededor del río, se podían encontrar electrodomésticos, neumáticos, plásticos, etc.

4.1.3. EDAR El Torno (Chiclana de la Frontera)

La primera toma de muestras en la EDAR Guadalete se realizó el 3 de mayo de 2021, se tomaron 2 L de la entrada, 2 L del intermedio 1 (entre el tratamiento primario y el tratamiento secundario), 2 L del intermedio 2 (entre el tratamiento secundario y el tratamiento terciario) y 2 L de la salida.

La segunda toma de muestras se realizó el 27 de mayo de 2021, tomando los mismos volúmenes y en los mismos puntos anteriormente mencionados.

Para la toma de muestras del vertido se realizaron tres muestreos como se puede observar en la [Figura 6](#):



*Figura 6 Puntos de muestreo EDAR El Torno
Fuente: Google Earth Pro y elaboración propia*

- Punto de muestreo 1: el primero en la zona de vertido en el río (Latitud: 36.427391 / Longitud: -6.156969).
- Punto de muestreo 2: el segundo aguas abajo de la zona de vertido para observar la dilución del vertido (Latitud: 36.427689 / Longitud: -6.157349). El punto de muestreo 2 se encuentra a 51 metros del punto de muestreo 1.
- Punto de muestreo 3: el tercero aguas arriba de la zona de vertido para tener un valor de referencia (Latitud: 36.426609 / Longitud: -6.156143). El punto de muestreo 3 se encuentra a 120 metros del punto de muestreo 1.

4.2. Técnicas analíticas y equipos

4.2.1. Medida de la demanda bioquímica de oxígeno (DBO₅)

La demanda bioquímica de oxígeno (DBO₅) es la cantidad de oxígeno disuelto (mg O₂/L) que necesitan los microorganismos para oxidar biológicamente la materia orgánica de un litro de agua residual, en oscuridad a una temperatura de 20°C y durante 5 días.

La DBO₅ sólo mide la MO biodegradable, y se utiliza como parámetro para decidir el tipo de tratamiento y la dimensión de los equipos de tratamiento de depuración de una EDAR.

Para la determinación de la DBO₅ se utilizaron las botellas OxiTop® (marca WTW) ([Figura I](#), fotos de los equipos en el [Anexo I](#)), este dispositivo se constituye de una botella ámbar y un manómetro o cabezal de medición con su tubo, también se utiliza un inhibidor de nitrificación.

En la botella ámbar se vierte la muestra con su volumen correspondiente, se añaden las gotas necesarias de inhibidor de nitrificación y en el tubo se introduce NaOH sólido, una vez hecho esto se enrosca el manómetro, se inicia su funcionamiento, y se introduce en el armario de incubación o termostático ([Figura II](#)) los agitadores para que mida la DBO₅ durante 5 días a una temperatura de 20°C.

Los microorganismos consumen O₂ y generan CO₂ al degradar la MO, este CO₂ al ser absorbido por el NaOH genera una presión negativa la cual es medida por OxiTop®, el valor obtenido se observa en el manómetro en forma de DBO en mg O₂/L.

Una vez pasado los 5 días se obtuvieron los valores en el manómetro, estos valores se multiplicaron por el factor de corrección correspondiente, el cual depende del volumen de muestra vertido, obteniendo así los valores de DBO₅ en mg O₂/L.

4.2.2. Medida de la demanda química de oxígeno (DQO)

La demanda química de oxígeno (DQO) es la cantidad de oxígeno (mg O₂/L) necesaria para oxidar químicamente la MO. Al medir la DQO se mide tanto la MO biodegradable como la MO no biodegradable, por ello, la DQO siempre debe ser mayor que la DBO₅, en ARUs “tipo”.

Para medir la DQO se utilizó un termorreactor ECO25 (marca VELP) ([Figura III](#)) con los correspondientes kits o viales con dicromato potásico (K₂Cr₂O₇). Los viales insertados en el equipo para cada EDAR fueron un blanco (agua miliQ) y diluciones 1:2 y 1:5 para la entrada, intermedio, intermedio 2 y salida.

Por otro lado, se prepararon viales con ftalato de potasio a diferentes diluciones teniendo en cuenta que la relación entre el ftalato y la DQO es: 1 mg ftalato = 1'176 mg O₂/L, para generar, con los valores de absorbancia a 600 nm, una recta de calibrado ($y = 0.0003x$, $R^2 = 0.9593$) y poder obtener los valores de DQO en mg O₂/L.

Una vez preparados los viales se pusieron en el termorreactor a 150°C durante 120 minutos (2 horas). Pasadas las 2 horas las muestras ya estaban listas para medirles la absorbancia en el espectrofotómetro.

4.2.3. Medida de los sólidos en suspensión (SS)

Los sólidos en suspensión (SS) es la cantidad de sólidos no filtrables que quedan retenidos en un filtro de tamaño de poro de $0{,}45\ \mu\text{m}$, e indican la cantidad de sólidos en suspensión presentes en una disolución.

Para medir los SS se utilizó una bomba de vacío, filtros de $0{,}45\ \mu\text{m}$, un matraz Kitasato y un embudo ([Figura IV](#)). Se utilizaron los filtros necesarios por cada muestreo en cada EDAR y en cada punto de vertido, analizando por duplicado cada muestra.

Primero se secaron los filtros en una estufa a 110°C y se pesaron, se filtró el volumen de muestra correspondiente, y se volvieron a secar y a pesar los filtros. Una vez secos, se calculó la diferencia entre el peso del filtro con muestra y del filtro sin muestra (en mg) y se multiplicó por el volumen filtrado (en L), obteniendo así la cantidad de SS en mg/L.

Para la realización del resto de mediciones se volvieron a filtrar 100 mL de las muestras sin diluir (entrada, intermedios, salida y punto de vertido) de cada EDAR con filtros de membrana de nitrato de celulosa de $0{,}45\ \mu\text{m}$.

Esta nueva filtración se realizó para la medición del espectro de absorbancia, de la fluorescencia, del pH y la conductividad, y del carbono orgánico no purgable (NPOC) y Nitrógeno total (NT).

4.2.4. Medida de pH y conductividad

El pH es una medida para determinar el grado de acidez o alcalinidad de una disolución, y la conductividad es la capacidad que tiene una solución para transportar la corriente eléctrica.

Para la medición de pH y conductividad se empleó el Multímetro MM 41 (marca Crison) ([Figura V](#)), se trata de un instrumento multiparamétrico con 2 canales de medida, se utilizó el canal 1 para medir el pH y la conductividad.

Para cada EDAR se midieron las muestras de entrada, intermedio, salida y puntos de vertido sin diluir, para la EDAR El Torno también se midió intermedio 2.

4.2.5. Medida del carbono orgánico no purgable (NPOC) y Nitrógeno total (NT)

El carbono orgánico total (COT) es la suma de todos los compuestos orgánicos en una muestra, este parámetro se utiliza para valorar la calidad del agua.

El equipo utilizado para la medición de NPOC (carbono orgánico no purgable) y de Nitrógeno Total Disuelto (NT) en muestras acuosas fue Total Organic Carbon Analyzer TOC-L CPH/CPN, marca SHIMADZU ([Figura VI](#)), cuya técnica consiste en la realización de una combustión catalítica a alta temperatura, y determina el COT por espectroscopía infrarroja no dispersiva y el NT por quimioluminiscencia.

4.2.6. Medidas cromatógrafo iónico

La concentración de aniones se analizó usando un cromatógrafo de iones (CI) 881-Compact IC Pro 1 (Metrohm) ([Figura VII](#)) equipado con una columna ASupp5 250/4.0 y un detector de conductividad.

La concentración de cationes se midió mediante un CI 882-Compact IC Plus 1 (Metrohm) utilizando una columna C4 250/4.0 y un detector de conductividad.

La fase móvil y la velocidad de flujo para el análisis de aniones y cationes era una mezcla de CO_3^{2-} (3.20 mM), HCO_3^- (1 mM) a una velocidad de 0.7 mL/min y HNO_3 (1.7 mM), $\text{C}_7\text{H}_5\text{NO}_4$ (0.7 mM) a una velocidad de 0.9 mL/min, respectivamente.

4.2.7. Medida de la absorbancia

Las absorbancias de cada muestra se midieron usando el espectrofotómetro UV/visible Jenway™ modelo 7315 ([Figura VIII](#)) equipado con una lámpara Xenón, obteniendo así los valores correspondientes de DQO.

Para la realización de las mediciones se utilizó una cubeta de 10 mm.

4.2.8. Medida del espectro de absorbancia UV-Visible

Los espectros de absorbancia UV-visible se midieron usando también el espectrofotómetro de un solo haz UV/visible Jenway™ modelo 7315 ([Figura VIII](#)).

Para la realización de las mediciones se utilizó una cubeta de cuarzo (10 mm) de dos caras transparentes. El rango de medida seleccionado fue de 200 a 800 nm, midiendo cada 5 nm.

Las medidas realizadas con el equipo fueron para cada EDAR: blanco (agua miliQ), entrada, intermedio, intermedio 2 y salida sin diluir y con diluciones 1:2, 1:5 y 1:10.

Los datos obtenidos se transfirieron a un USB (Jenway™ modelo 7315 incluye un puerto USB) para su posterior uso en PARAFAC.

4.2.9. Medida de la fluorescencia

Se midieron matrices de excitación-emisión (EEMs) para cada muestra usando el espectrofluorímetro JASCO FP-8300 ([Figura IX](#)) equipado con una lámpara Xenón de 150W, y con un sistema óptico compuesto por dos monocromadores de red cóncava de difracción para excitación y emisión. El rango de medida seleccionado fue para la excitación de 240 nm a 450 nm (midiendo cada 5 nm) y para la emisión de 300 a 560 nm (midiendo cada 1 nm). Para la realización de la medición se utilizó una cubeta de cuarzo (10 mm) de cuatro caras transparentes.

Las medidas realizadas con este instrumento fueron para cada muestra filtrada, obteniendo en todo momento un blanco (con agua miliQ), el espectro característico de fluorescencia del agua, Raman (con excitación a 350 nm), puntos de vertido sin diluir, y entrada, intermedio y salida sin diluir y con tres diluciones (1:2, 1:5 y 1:10), para la EDAR El Torno también se midió el intermedio 2. El registro de un blanco y un Raman se utilizó para calibrar la intensidad de la fluorescencia en PARAFAC.

Para el control del equipo y la obtención de las medidas se utilizó en software Spectra Manager. Los datos obtenidos se transfirieron a un USB para su posterior uso en PARAFAC.

4.3. Análisis de factores paralelos (PARAFAC) para analizar matrices de excitación-emisión (EEMs) de fluorescencia

4.3.1. Matriz de excitación-emisión (EEM) de fluorescencia

Una matriz de excitación-emisión (EEM) de fluorescencia es un gráfico de dos dimensiones que se obtiene al realizar un escaneo espectral de las longitudes de onda de emisión a partir de las distintas longitudes de onda de excitación ([Figura 7](#)).

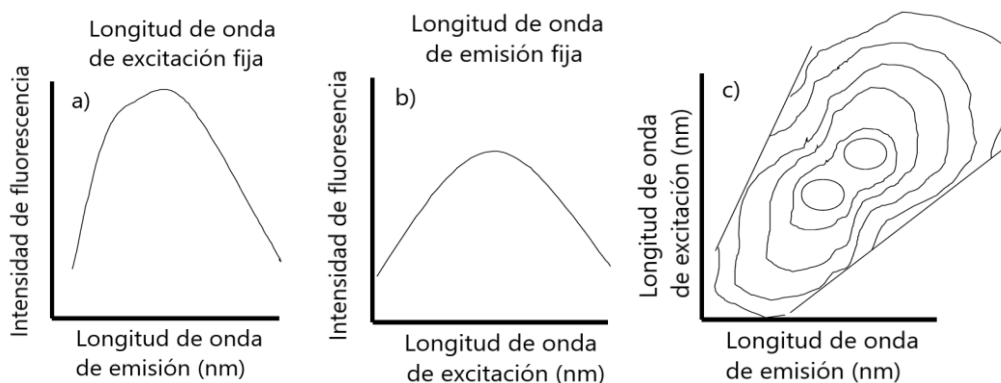


Figura 7 (a) Espectro de emisión de fluorescencia, (b) Espectro de excitación de fluorescencia, y (c) Una EEM de fluorescencia.

Fuente: Tomado y adaptado de Ramanujam, 2000

La adquisición de EEMs de fluorescencia se desarrolló a partir de 1980 (Ghosh y Schnitzer, 1980; Hershberger, 1981; Kallir, 1986), y nos permite obtener de la muestra la huella fluorométrica de la muestra acuosa y relacionarla con los componentes químicos (fluoróforos) de las sustancias que la componen.

Las EEMs se agrupan formando un conjunto tridimensional, pudiéndose ajustar así al modelo trilineal PARAFAC.

4.3.2. PARAFAC (PARAllel FACtor analysis)

El análisis de factores paralelos (PARAFAC: PARAllel FACtor analysis) es un modelo matemático trilineal que descompone las EEMs en componentes químicamente significativos (Andersen y Bro, 2003; Smilde et al., 2004), y separa la contribución de diferentes fluoróforos sin suposiciones adicionales sobre sus espectros de excitación y emisión (Cohen et al. 2014), facilitando así la identificación y cuantificación de los componentes.

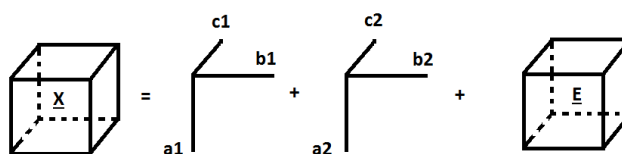
El modelo PARAFAC de una matriz tridimensional descompone la señal de datos en un conjunto de términos trilineales y una matriz residual ([Ec. 1](#)):

$$x_{ijk} = \sum_{f=1}^F a_{if} b_{jf} c_{kf} + e_{ijk}$$

Ec. 1.

donde $i = 1, \dots, I$; $j = 1, \dots, J$; $k = 1, \dots, K$

El conjunto de términos trilineales viene dado por tres matrices A, B y C con elementos a_{if} , b_{jf} y c_{kf} , donde i , j y k corresponden a las muestras, la emisión y la excitación, respectivamente, y cada f corresponde a un componente PARAFAC. Y la matriz residual viene dada por la matriz E con el elemento e_{ijk} , que corresponde al residuo que representa la variabilidad no contabilizada por el modelo (Bro, 1997; Andersen y Bro, 2003) ([Figura 8](#)).



*Figura 8 Representación gráfica de la matriz de datos X para un modelo PARAFAC de dos componentes.
Fuente: Bro, 1997*

Los métodos bilineales tienen el problema de libertad de rotación, ésta hace que haya infinitas soluciones que proporcionan el mismo ajuste y esto provoca que no sea posible

estimar los espectros puros. A PARAFAC no le afecta este problema, debido a que es un método trilineal y obtiene una solución única (Bro, 1997).

4.3.3. EEM-PARAFAC

PARAFAC puede analizar matrices de tres dimensiones como el conjunto de EEMs de fluorescencia (Muestras \times Longitud de onda de excitación \times Longitud de onda de emisión) (Figura 9).

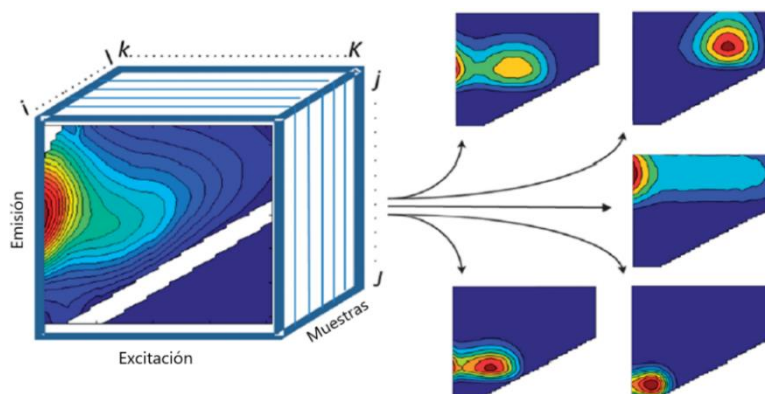


Figura 9 Conjunto de datos de EEMs organizado en una estructura de tres dimensiones (Muestras $\times \lambda_{ex} \times \lambda_{em}$) y descompuesto en cinco componentes mediante PARAFAC.

Fuente: Tomado y adaptado de Murphy et al., 2013

Para el análisis de EEMs aplicando PARAFAC se ha usado el software MATLAB R2021a con las herramientas de drEEM (decomposition routines for Excitation-Emission Matrices) (Murphy et al., 2013), y la aplicación EEMlab v026 (Micó et al., 2019), que es una interfaz gráfica de usuario (GUI) que facilita la carga y el pretratamiento de los datos, y, mediante PARAFAC, el análisis de los datos y la validación de los modelos obtenidos.

El esquema de trabajo utilizando la aplicación EEMlab se resumen en la Figura 10.

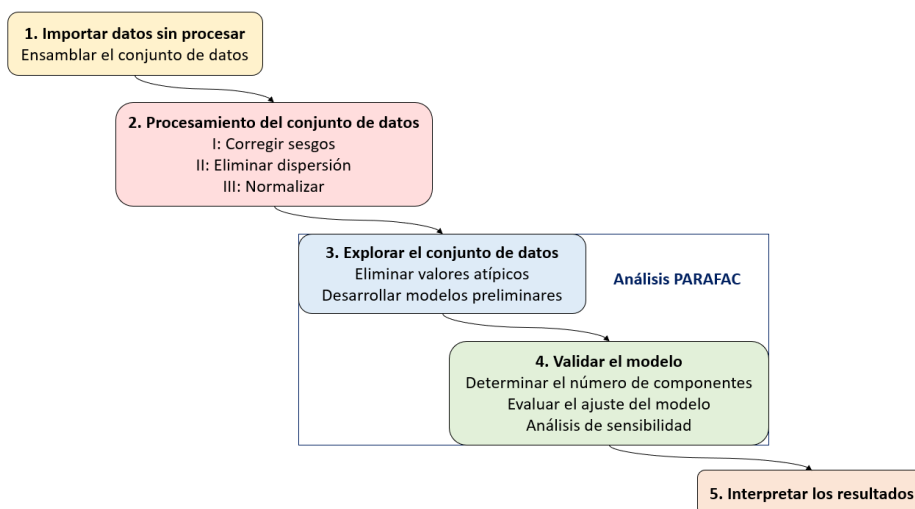


Figura 10 Esquema de los pasos del análisis PARAFAC de matrices de excitación-emisión (EEMs) de fluorescencia en EEMlab.

Fuente: Tomado y adaptado de Murphy et al., 2013

A continuación, se explican los pasos seguidos con la aplicación EEMlab:

1. Importación de datos

Para importar los datos se generó un Excel “sample log” en el cual se incluyen los parámetros fotométricos medidos (Puntos [4.2.8](#) y [4.2.9](#)) y las relaciones entre los diferentes archivos que lo componen (EEMs, espectros de absorbancia, blancos, Raman, factores de dilución, etc.).

Una vez generado, se configuró el experimento con los equipos utilizados (espectrofluorímetro y espectrofotómetro) y se cargó el Excel en EEMlab.

A continuación, se cargaron las EEMs de las muestras, se disponen de unas 30-40 matrices, dependiendo de la EDAR.

2. Preprocesamiento

La fase de preprocesamiento tiene tres objetivos principales (Murphy et al., 2013):

- a) Corregir cualquier sesgo sistemático en el conjunto de datos.
- b) Eliminar las interferencias no relacionadas con la fluorescencia.
- c) Normalizar el conjunto de datos si tienen grandes diferencias de intensidad entre las muestras.

a) Preprocesamiento I: Corrección de sesgos

Los datos no procesados están intrínsecamente sesgados por lo que deben corregirse para no introducir falsas interacciones entre los datos, por lo tanto, en primer lugar, se corrigieron los sesgos sistemáticos del conjunto de datos.

El efecto de filtro interno (IFE: *Inner Filter Effect*) ocurre cuando la matriz de la muestra absorbe la radiación al entrar o salir de la cubeta, reduciendo la cantidad de luz de excitación absorbida por los cromóforos en el centro de la cubeta y la cantidad de luz emitida que incide sobre el detector (Murphy et al., 2013), por lo que hay que corregirlo, para ello se cargaron los espectros de absorbancia. También se realizaron las correcciones de los blancos (agua miliQ), del Raman y de los factores de dilución.

Una vez cargados todos los archivos de corrección, se corrigieron las EEMs de las muestras.

b) Preprocesamiento II: Eliminación de la dispersión

En segundo lugar, se eliminó la dispersión provocada por Rayleigh (efecto de dispersión de la luz) y Raman, las cuales presentan picos (primarios y secundarios) de dispersión diagonales causados por distintos fenómenos de fluorescencia. Los

datos afectados se eliminaron y se reemplazaron por mediciones interpoladas de cualquier lado de la banda de dispersión.

c) Preprocesamiento III: Normalización

En tercer lugar, se normalizó el conjunto de datos dividiendo por la suma del valor al cuadrado de todas las variables de la muestra. La normalización se realiza porque las muestras con una mayor intensidad de fluorescencia ejercen una mayor influencia, y la fluorescencia de los fluoróforos independientes tiende a covariar en el conjunto de datos, vulnerando el supuesto de variabilidad (Murphy et al., 2013). La normalización da a las muestras de alta y baja concentración ponderaciones similares permitiendo que el modelo se centre en las variaciones químicas entre muestras en lugar de en la magnitud de las señales totales.

3. Fase exploratoria

El objetivo es establecer el mejor conjunto de datos posible para modelar y obtener una idea preliminar sobre el número de componentes que puede contener el modelo PARAFAC.

En esta fase se pueden explorar muchos aspectos del conjunto de datos para tener una mayor idea sobre este: cargas espectrales, correlaciones entre componentes, longitudes de onda, cargas e influencias (loadings y leverages), errores residuales, suma espectral de errores cuadrados (SSE: Spectral Sum of Squared Error), consistencia del núcleo, etc.

Se examinaron y eliminaron las muestras o valores atípicos (outliers), los cuales no son representativos del resto del conjunto de datos. Para identificar los valores atípicos se recurrió a la inspección manual de los gráficos de las muestras, a la estructura de los residuos de error, y a los gráficos de influencia (leverage).

4. Validación del modelo

Una interpretación válida de un modelo PARAFAC se basa en que se haya obtenido el número correcto de componentes (Murphy et al., 2013), con el fin de relacionarlos con fluoróforos específicos de las muestras.

Para evaluar si se especificó el número de componentes correcto se analizaron varios métodos en combinación (influencias, errores residuales, etc.), debido a que los métodos analizados individualmente no dan la solución única y verdadera sobre el número de componentes.

Una vez asumido un número probable de componentes del modelo se ejecutó el modelado PARAFAC más restrictivo para refinar el modelo. Al modelar el conjunto de datos, para asegurarnos que el modelo es apropiado e independiente de las submuestras del conjunto de datos, se aplicó el análisis de la mitad dividida (Split-half analysis).

Split-half analysis hace que el conjunto de datos se divida en varias mitades que se modelan con el mismo número de componentes y, posteriormente, se evalúa la concordancia que existe entre los modelos de las diferentes mitades y del conjunto de datos completo.

Por último, se validaron los modelos con un coeficiente de correlación de 0.95, con la validación se obtuvieron las “huellas dactilares” de los componentes.

Un ejemplo de todo el proceso y modelado PARAFAC, se muestra paso a paso en el [Anexo II](#), al final del presente documento.

5. Interpretación de resultados

Una vez obtenidos los componentes PARAFAC del modelo validado se ha procedido a la interpretación de éstos, comprobando si algún componente de las “huellas dactilares” puede atribuirse a algún analito químico específico.

Para ello, se ha tomado como referencia la [Figura 11](#), donde se puede observar como la MODF_A se encuentra a longitudes de onda inferiores a 350 nm y cuyos picos de emisión suelen ser más estrechos, mientras que los picos de MODF_H se encuentran a longitudes de onda superiores a 350 nm y suelen ser más amplios.

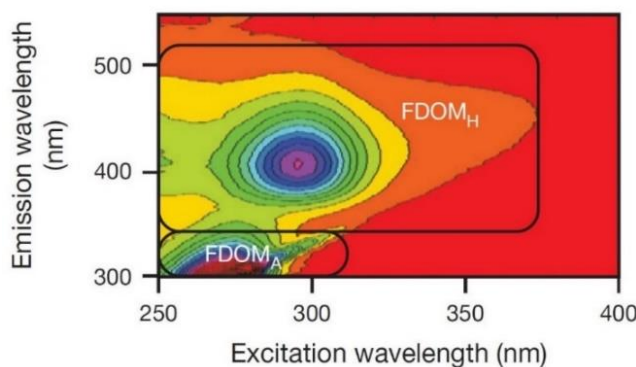


Figura 11 Zonas correspondientes de la MODF_A y de la MODF_H en las EEMs
Fuente: Stubbins y Dittmar, 2014

Para analizar los diferentes picos encontrados en las zonas de MODF_A y MODF_H, se ha utilizado la [Figura 12](#) la cual nos muestra los principales picos de EEMs que podemos encontrar en las ARUs (tomado y adaptado Rodríguez-Vidal et al., 2020):

- Picos similares a las proteínas (MODF_A): picos Trp1 y Trp2 (similares al triptófano), picos Tir1 y Tir2 (similares a la tirosina).

- Picos de tipo húmico ($MODF_H$): pico F (tipo fúlvico), picos H1 y H2 (tipo húmico).

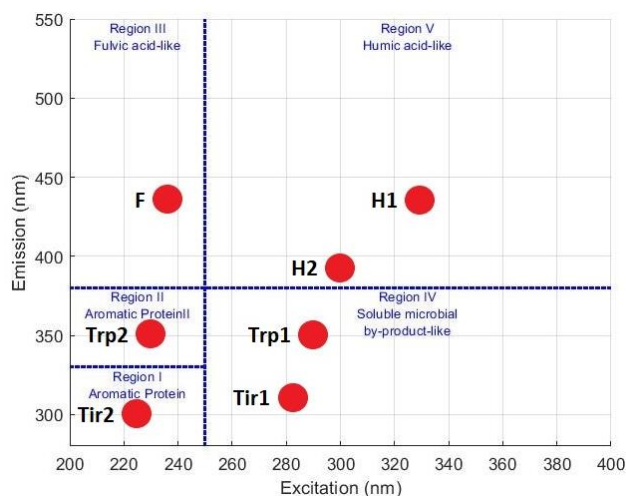


Figura 12 Ubicación de los principales picos de EEMs
Fuente: tomado y adaptado de Rodríguez-Vidal et al., 2020

PARAFAC descompone las intensidades máximas de fluorescencia en valores llamados “scores” o puntuaciones, éstos están directamente relacionados con la concentración relativa o la intensidad de los componentes individuales (fluoróforos) en cada muestra. Por lo tanto, para visualizar y evaluar la variación de los distintos componentes encontrados en las muestras se han representado los scores obtenidos.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Evaluación de los parámetros medidos

5.1.1. Demanda bioquímica de oxígeno (DBO_5)

En primer lugar, se representan las concentraciones de DBO_5 a la salida de las tres EDARs, así como sus porcentajes de reducción (Figura 13).

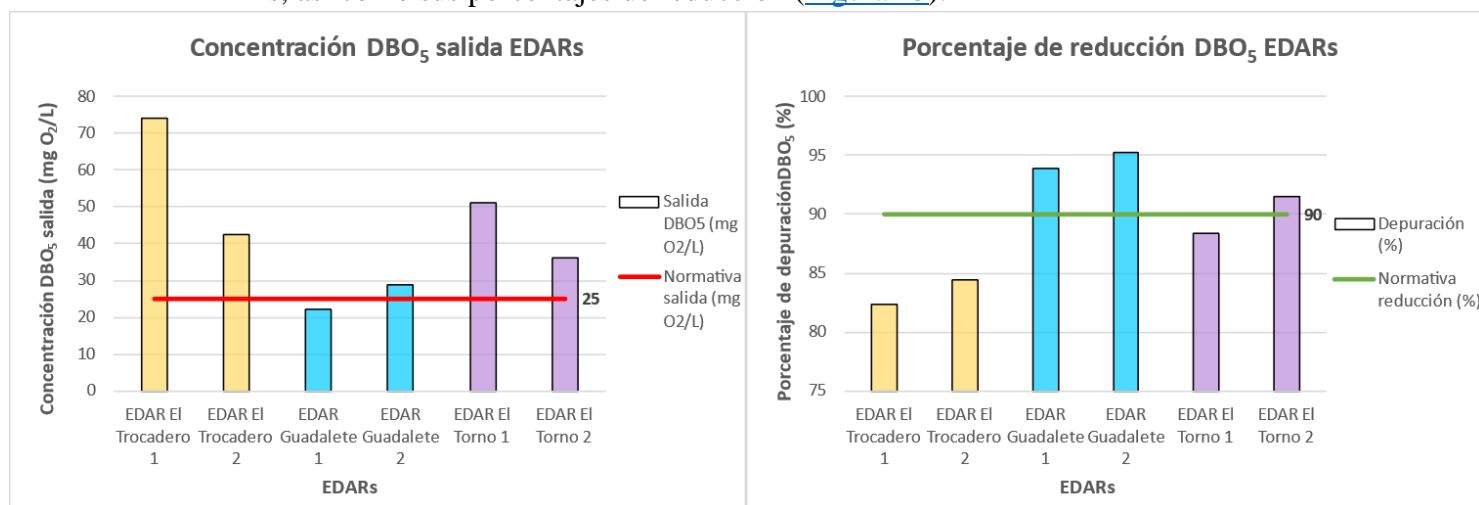


Figura 13 Concentración DBO_5 a la salida de las EDARs (izquierda) y porcentaje de reducción de la DBO_5 en las EDARs (derecha)

La legislación ([Tabla 2](#)) establece el límite de vertido de DBO₅ en valores inferiores a 25 mg O₂/L o con un porcentaje de reducción igual o superior al 90%.

Atendiendo a estos dos criterios establecidos, se obtiene que se cumple la normativa en los dos muestreos de la EDAR Guadalete, y en la segunda toma de muestras de la EDAR El Torno (EDAR El Torno 1), mientras que la EDAR El Trocadero no cumple la normativa en ninguno de sus dos muestreos realizados.

Cabe destacar, que el valor de DBO₅ de la entrada correspondiente al segundo muestreo de la EDAR El Trocadero era inferior al del intermedio y al de la entrada del primer muestreo, pudiéndose atribuir a las posibles particularidades de la muestra rojiza, por la presencia de algún posible componente tóxico.

5.1.2. Demanda química de oxígeno (DQO)

En la [Figura 14](#) se han comparado las concentraciones de DQO a la salida de las tres EDARs y sus porcentajes de reducción:

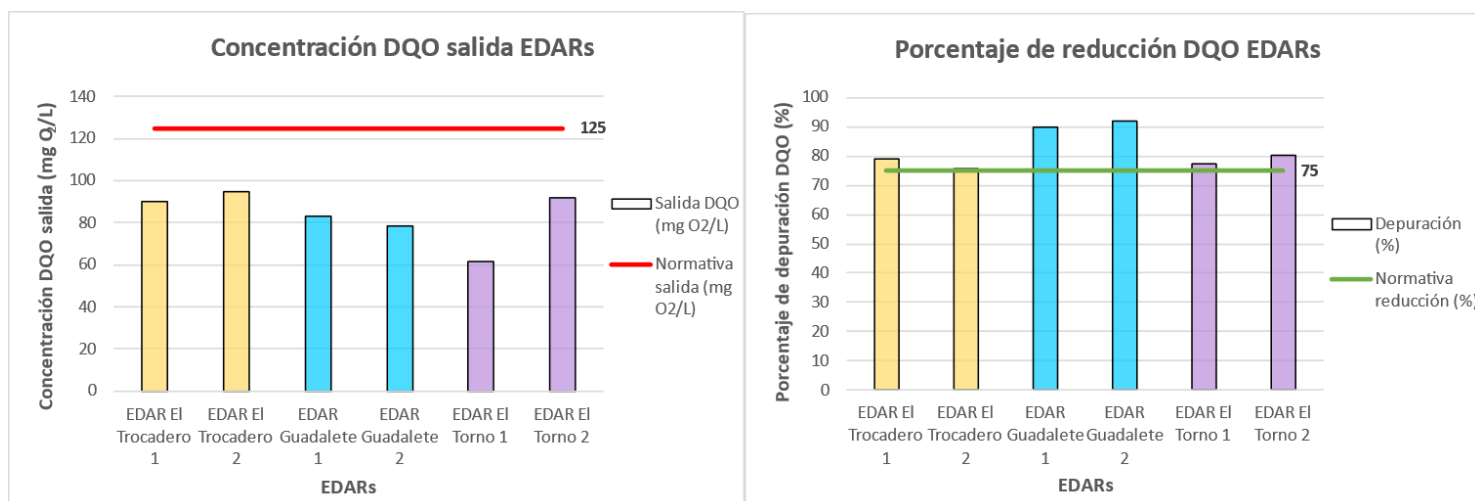


Figura 14 Concentración DQO a la salida de las EDARs (izquierda) y porcentaje de reducción de la DQO en las EDARs (derecha)

La legislación ([Tabla 2](#)) establece el límite de vertido de DQO en valores inferiores a 125 mg O₂/L o con un porcentaje de reducción igual o superior al 75%.

Atendiendo a estos dos criterios establecidos, se obtiene que se cumple la normativa en todos los muestreos realizados en las tres depuradoras, ninguna supera la concentración establecida y todas llegan al porcentaje de reducción.

5.1.3. Sólidos en suspensión (SS)

En la [Figura 15](#) se han comparado las concentraciones de SS a la salida de las tres EDARs y sus porcentajes de reducción:

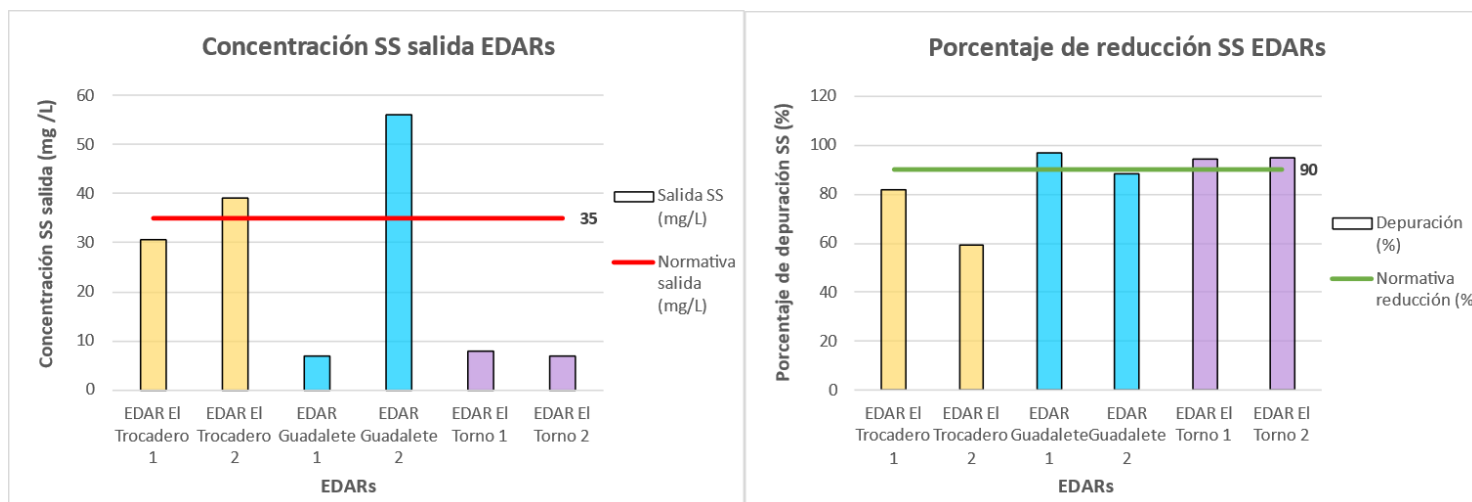


Figura 15 Concentración SS a la salida de las EDARs (izquierda) y porcentaje de reducción de los SS en las EDARs (derecha)

La legislación ([Tabla 2](#)) establece el límite de vertido de SS en valores inferiores a 35 mg/L o con un porcentaje de reducción igual o superior al 90%. Sin embargo, el parámetro de SS es optativo, aunque la concentración no debe superar los 150 mg/L.

Atendiendo a estos dos criterios establecidos, se obtiene que se cumple la normativa en las primeras tomas de muestras de la EDAR El Trocadero (EDAR El Trocadero 1) y Guadalete (EDAR Guadalete 1), y en los dos muestreos de la EDAR El Torno.

No obstante, al ser un parámetro optativo, las tres depuradoras cumplirían los límites de vertido de SS ya que ninguna supera la concentración de 150 mg/L a la salida.

5.1.4. pH y Conductividad

En la [Figura 16](#) se han comparado los valores de pH y de conductividad a la entrada y a la salida en las tres EDARs:

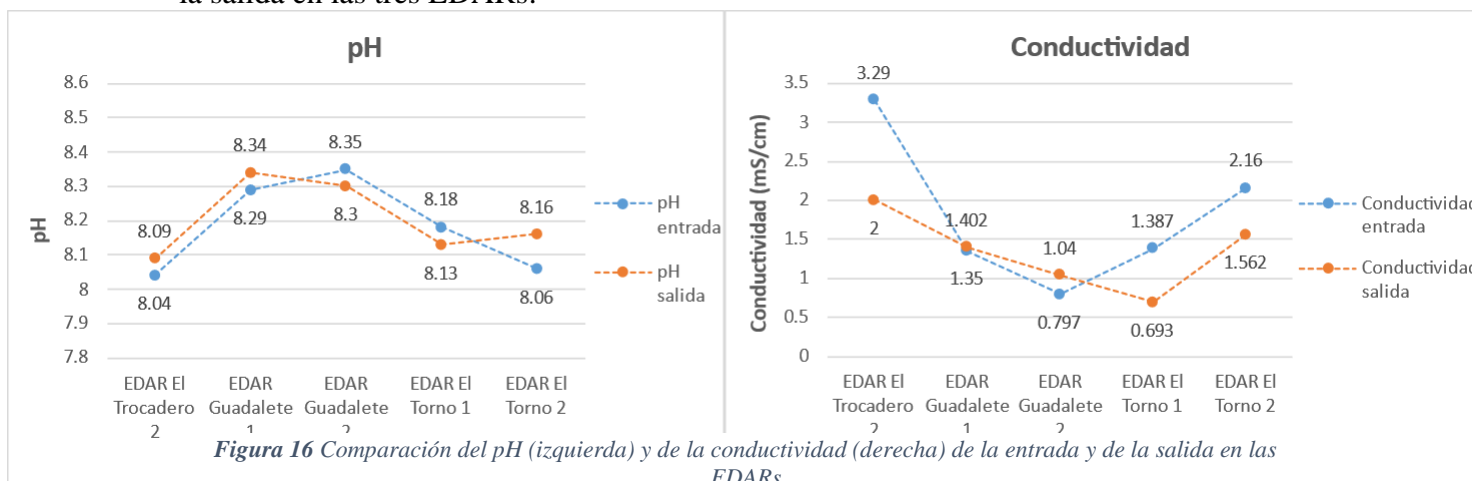


Figura 16 Comparación del pH (izquierda) y de la conductividad (derecha) de la entrada y de la salida en las EDARs

Se eliminaron los valores de pH y conductividad del primer muestreo de la EDAR El Trocadero (EDAR El Trocadero 1) debido a errores instrumentales. Cabe destacar que la muestra de la entrada del segundo muestreo de la EDAR El Trocadero (EDAR El Trocadero 2) tenía un color rojizo.

Los valores de pH y conductividad a la salida de la EDAR se deben tener en cuenta ya que, si el agua del efluente tiene un pH muy ácido o básico y/o una alta conductividad, puede afectar a la zona de vertido, alterando la composición de las aguas naturales.

Los valores de pH en las ARUs oscilan entre 5.5 y 9.5 (Decreto 109/2015, de 17 de marzo de 2015), por lo tanto, los valores obtenidos tanto a la entrada como a la salida de las EDARs estarían en un rango correcto.

Los valores de conductividad también se encuentran en un rango correcto, aunque se debe destacar el valor de la entrada del segundo muestreo de la EDAR El Trocadero (EDAR El Trocadero 2) el cual es muy superior al resto de mediciones, esta es la muestra de color rojizo la cual puede contener algún compuesto que aporte conductividad.

Se concluye que los efluentes no deben causar problema alguno en la zona de vertido.

5.1.5. Carbono orgánico no purgable (NPOC) y Nitrógeno Total (NT)

En las Figuras 17, 18 y 19 se han representado los valores de NPOC y de NT de las tres EDARs a lo largo del tratamiento de depuración y en la zona de vertido:

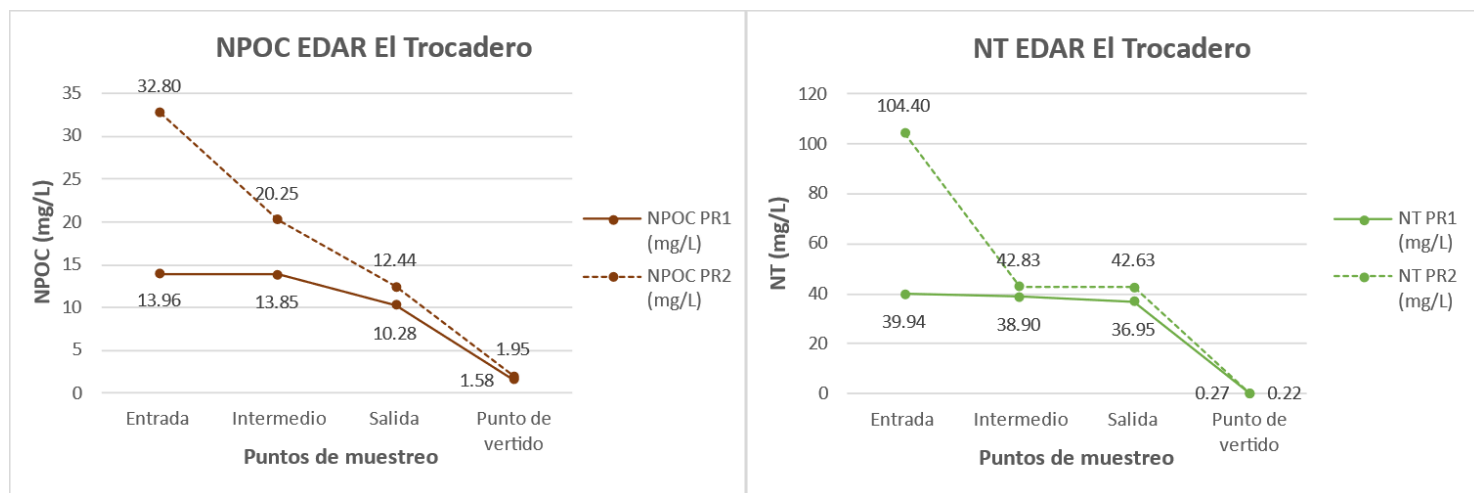


Figura 17 Valores de NPOC (izquierda) y de NT (derecha) para los dos muestreos de la EDAR El Trocadero.

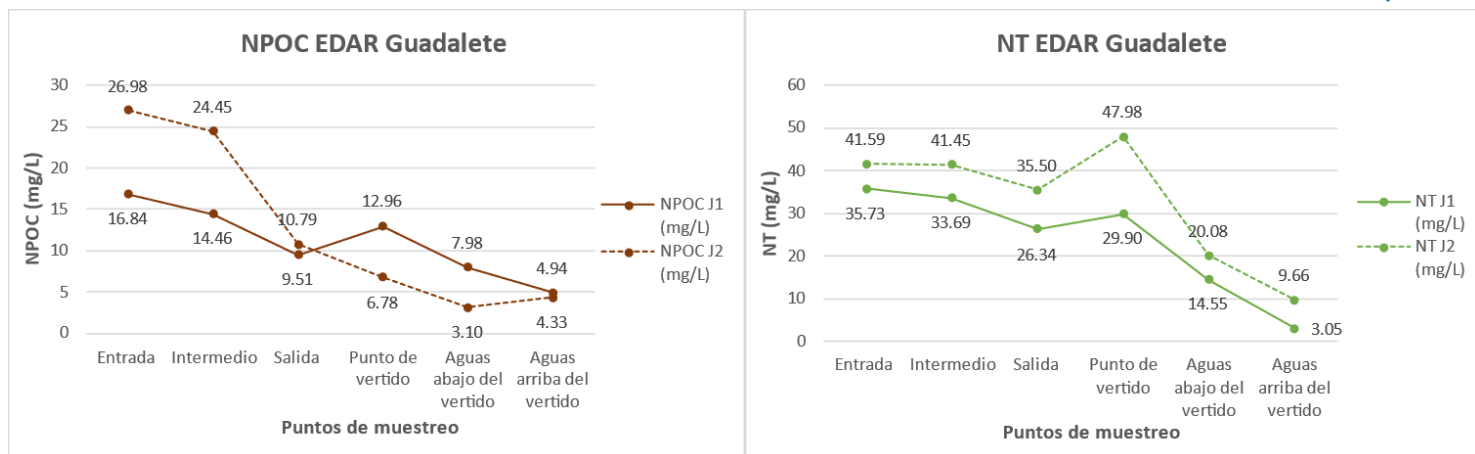


Figura 18 Valores de NPOC (izquierda) y de NT (derecha) para los dos muestreos de la EDAR Guadalete.

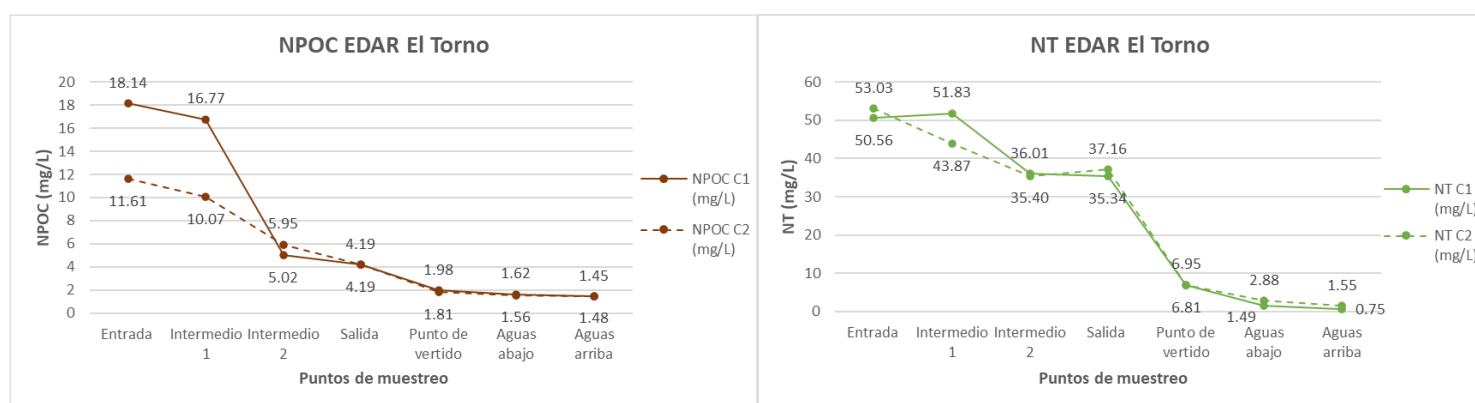


Figura 19 Valores de NPOC (izquierda) y de NT (derecha) para los dos muestreos de la EDAR El Torno

El valor de NPOC depende del carbono orgánico presente en las aguas residuales, cuanto más bajo sea el valor de NPOC en la salida mayor eficacia tiene el tratamiento de depuración (Madiraju et al., 2018).

En concordancia con este hecho, en las tres EDARs (Figuras 17, 18 y 19) se observa una disminución de los valores de NPOC a lo largo del tratamiento de depuración y, posteriormente, en la zona de vertido, siendo mayor esta disminución después del tratamiento primario. En el primer muestreo de la EDAR Guadalete (NPOC J1) (Figura 18) se observa que en el punto de vertido aumenta el valor, esto puede deberse a que días anteriores de la toma de muestras hubo fuertes episodios de lluvia intensa, y cuando esto ocurre las EDARs vierten ARUs sin depurar por los aliviaderos.

Por otro lado, el NT también debe disminuir a lo largo del tratamiento de depuración y, posteriormente, en la zona de vertido. En la entrada del segundo muestreo de la EDAR El Trocadero (NT PR2) (Figura 17) se ha obtenido un valor muy alto ya que el NT suele estar en el rango de 25-50 mg/L, con esto se puede asociar el muestreo de color rojizo con compuestos nitrogenados.

5.1.6. Aniones y cationes

En la [Figura 20](#) se han representado los valores de los distintos iones que se han identificado en las muestras de las tres EDARs a lo largo del tratamiento de depuración y en la zona de vertido:

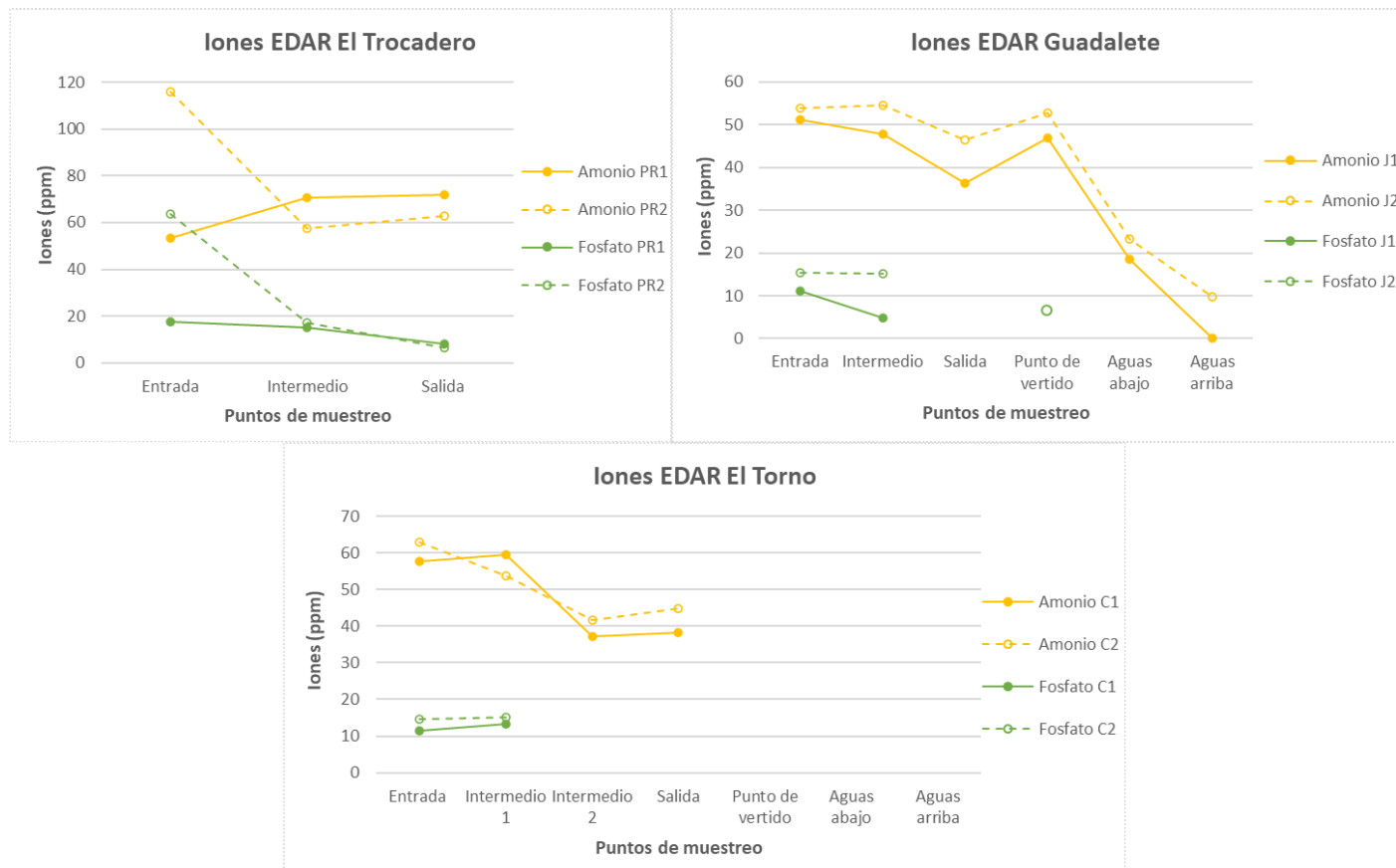


Figura 20 Iones estudiados en las EDARs El Trocadero (izquierda), Guadalete (derecha) y El Torno (abajo).

En la entrada del segundo muestreo de la EDAR El Trocadero (Amonio PR2) se ha obtenido un valor muy alto de amonio, al igual que con la [Figura 17](#), se puede asociar la muestra de color rojizo a compuestos nitrogenados, también se ha obtenido un valor alto de fosfato. Los valores de NT de la EDAR Guadalete ([Figura 18](#)) y de la EDAR El Torno ([Figura 19](#)) se atribuyen al amonio presente en las muestras, ya que las gráficas tienen tendencias prácticamente iguales, en estas dos EDARs el fosfato, con el tratamiento primario, desaparece ya que sus valores están por debajo el límite de detección (1.25 ppm), al igual que pasa con el amonio en la zona de vertido (0.5 ppm).

5.2. Resultados EEM-PARAFAC

5.2.1. EDAR El Trocadero (Puerto Real)

Tras seguir con la aplicación EEMlab el procedimiento explicado en el [apartado 4.3.3](#). (explicación completa en el [Anexo II](#)), se han seleccionado del conjunto de datos

corregido ocho EEMs correspondientes a la entrada, el intermedio, la salida y el punto de vertido para la EDAR El Trocadero ([Figura 21](#)):

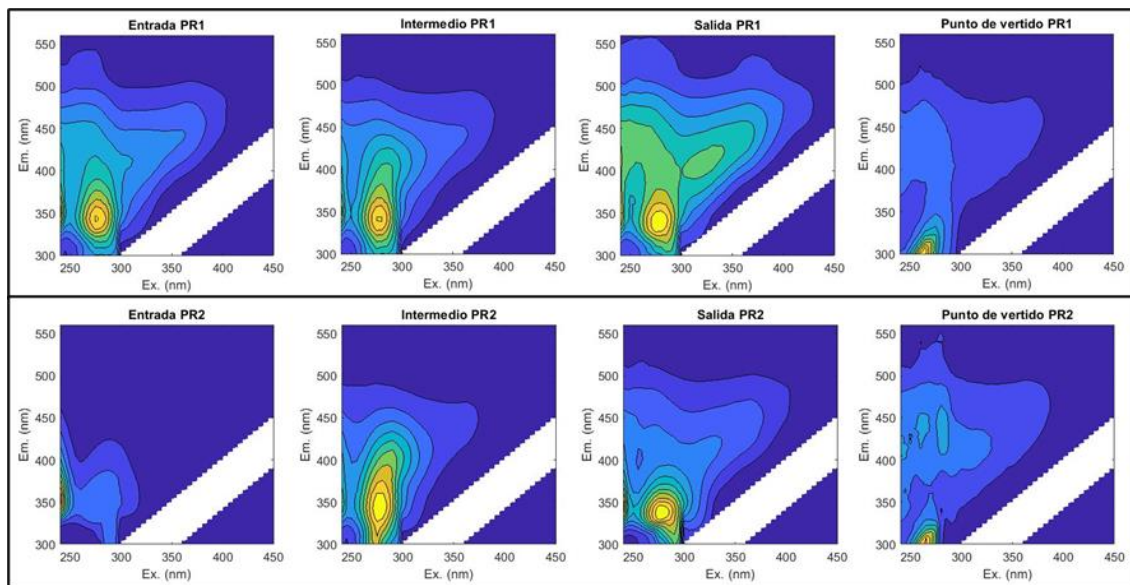


Figura 21 Gráfico con las EEMs corregidas representando el sistema de depuración y la zona de vertido de la EDAR El Trocadero.

El tratamiento primario de depuración tiene poco efecto sobre los compuestos, tanto los asociados a proteínas como a húmicos (Yu et al., 2010; Cohen et al., 2014), por lo que es esperable que no se muestren diferencias en las intensidades de fluorescencia en las zonas $MODF_A$ y $MODF_H$. Sin embargo, el tratamiento secundario si elimina con intensidad los compuestos asociados a las proteínas ($MODF_A$) (Cohen et al., 2014), esto se debería observar en las EEMs de la salida de la EDAR El Trocadero ([Fig. 21](#): Salida PR1 y PR2), en cambio, no se da esa disminución de la intensidad de fluorescencia en la zona $MODF_A$, lo que es indicativo de que el tratamiento de depuración no se está realizando correctamente, ya que apenas hay modificación en la matriz EEM.

Del segundo muestreo se destaca la muestra de la entrada ([Fig. 21](#): Entrada PR2), la cual muestra una intensidad de fluorescencia distinta a la de la entrada del primer muestreo (Entrada PR1). Como se ha comentado anteriormente (resultados del [apartado 5.1](#)), esta muestra tiene un color rojizo y parece contener compuestos nitrogenados detectados en los análisis previos (conductividad, NT, CI). A través de la visualización de las EEMs de fluorescencia se puede identificar este suceso anómalo, ya que sus intensidades de fluorescencia cambian con respecto al primer muestreo.

En las dos tomas de muestras del punto de vertido ([Fig. 21](#): Punto de vertido PR1 y PR2), se puede observar una EEM distinta al resto y una intensidad de fluorescencia prácticamente igual. Además, el pico de intensidad máxima es distinto en el punto de

vertido del observado durante el tratamiento de depuración (pico correspondiente a ARUs mal depuradas), lo que nos indica que la zona de vertido no estaría afectada por la contaminación de las ARUs de la EDAR.

Durante este procedimiento se realizó el análisis de las EEMs mediante PARAFAC y se obtuvieron los mejores resultados para un modelo de seis componentes. En la [Figura 22](#) se muestran los picos máximos de intensidad de fluorescencia para los seis componentes específicos obtenidos mediante el análisis PARAFAC para la EDAR El Trocadero, y en la [Tabla 4](#) se muestran los máximos de excitación y emisión para cada uno de los componentes, estos valores se han asociado a unos picos correspondientes siguiendo la [Figura 12](#), siguiendo esto en la [Figura 23](#) se han representado los seis componentes indicando los diferentes picos que se les asocian.

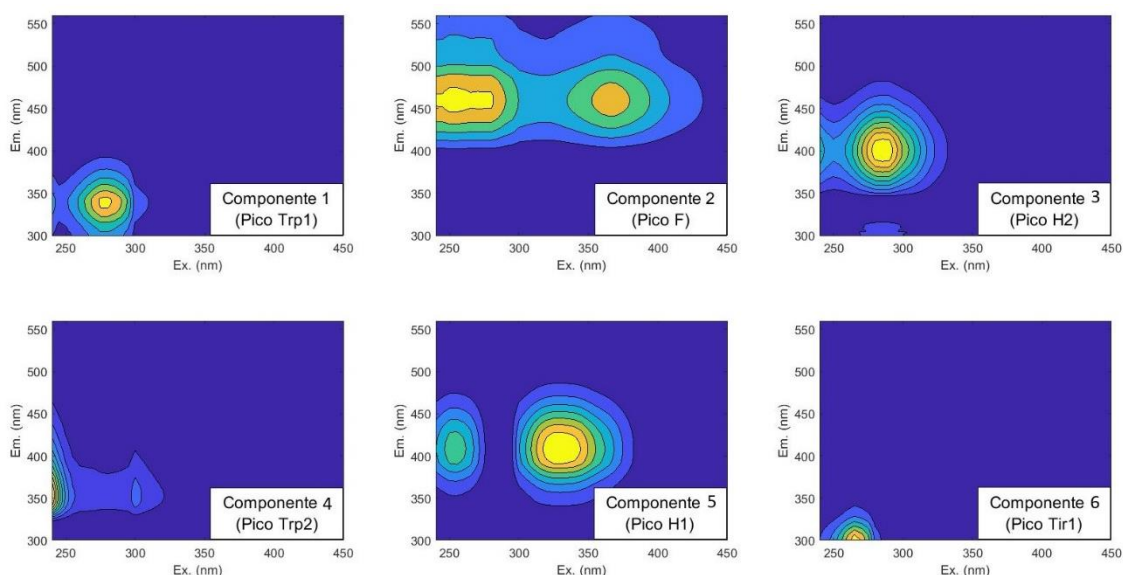


Figura 22 Gráfico de “huellas dactilares” de 6 componentes para la EDAR El Trocadero.

Tabla 4 Máximos de excitación y emisión de cada componente determinado por el análisis PARAFAC para la EDAR El Trocadero

Componente	Máximo Ex / Máximo Em
C1 (Pico Trp1)	280/339
C2 (Pico F)	255/460
C3 (Pico H2)	285/403
C4 (Pico Trp2)	245/351
C5 (Pico H1)	330/409
C6 (Pico Tir1)	265/302

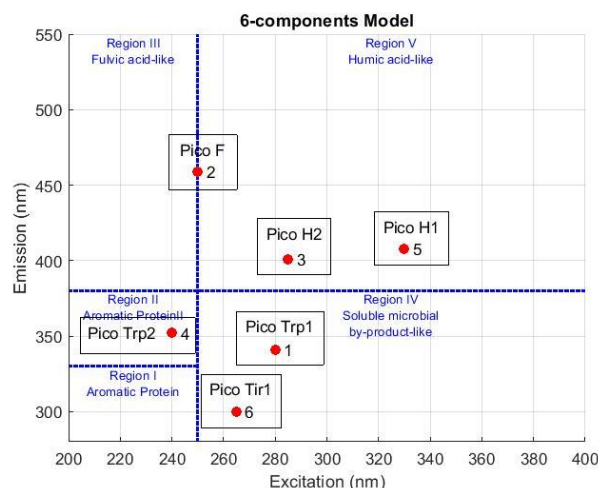


Figura 23 Mapa de 6 componentes con sus picos correspondientes para la EDAR El Trocadero.

Tras el análisis PARAFAC se han obtenido seis componentes específicos para la EDAR El Trocadero, de los cuales tres se han relacionado con sustancias de tipo proteico (C1, C4 y C6) y tres con sustancias de tipo húmicas (C2, C3 y C5):

- El componente 1 (C1) se encuentra en la zona de los compuestos similares a proteínas, en concreto, donde se define el pico asociado al triptófano (pico Trp1). El pico Trp1 procede de materia orgánica perteneciente a aguas residuales urbanas sin depurar (Wu et al., 2011; Baker et al., 2015) y se considera un indicador de material antropogénico en aguas naturales (Galapate et al., 1998; Baker et al., 2004; Reynolds, 2003).
- El componente 2 (C2) se encuentra en la zona de los compuestos similares a húmicos, en concreto, donde se define el pico asociado al fúlvico (pico F). El pico F está asociado a sustancias de origen natural, por lo que es característico de ambientes poco contaminados.
- El componente 3 (C3) se encuentra en la zona de los compuestos similares a húmicos, en concreto, donde se define el pico asociado al húmico (pico H2). El pico H2 representa la MOD que ha sido modificada por degradación microbiana (Stedmon y Markager, 2005b).
- El componente 4 (C4) se encuentra en la zona de los compuestos similares a proteínas, en concreto, donde se define el pico asociado al triptófano (pico Trp2). El Pico Trp2, al igual que el pico Trp1, se asocia a ambientes con impacto antropogénico.
- El componente 5 (C5) se encuentra en la zona de los compuestos similares a húmicos, en concreto, donde se define el pico asociado al húmico (pico H1). El pico H1, al igual que el pico F, está asociado a sustancias de origen natural, por lo que es característico de ambientes poco contaminados, y se puede asociar a productos de degradación microbiana procedentes de compuestos húmicos terrestres (Lyon et al., 2014).
- El componente 6 (C6) se encuentra en la zona de los compuestos similares a proteínas, en concreto, donde se define el pico asociado a la tirosina (pico Tir1). El pico Tir1 se encuentra en todas las aguas marinas (Mayer et al., 1999; Yamashita y Tanoue, 2003).

Una vez identificados los seis componentes obtenidos con el análisis PARAFAC, se han representado los scores (puntuaciones) de cada componente para cada punto de muestreo realizado, para visualizar y evaluar la evolución de estos componentes a lo largo del tratamiento de depuración y en la zona de vertido (Figuras 24 y 25):

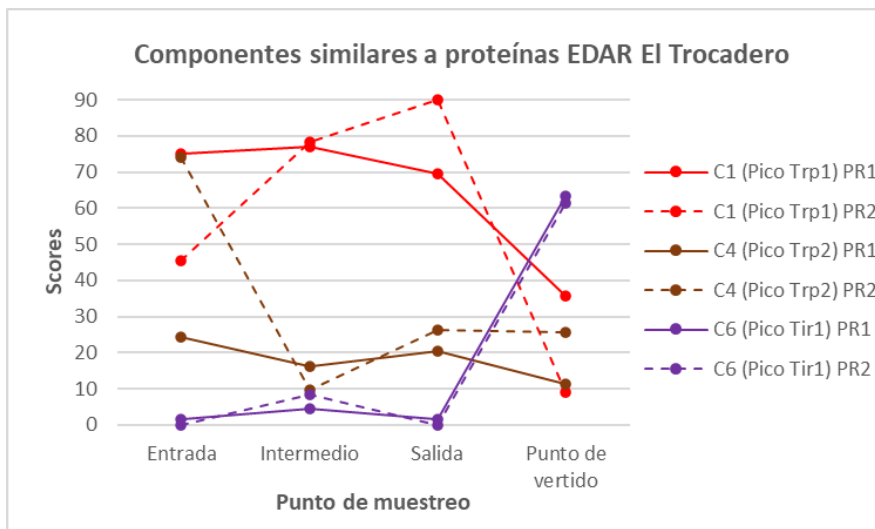


Figura 24 Evolución de los componentes similares a proteínas durante el sistema de depuración y en el punto de vertido de la EDAR El Trocadero.

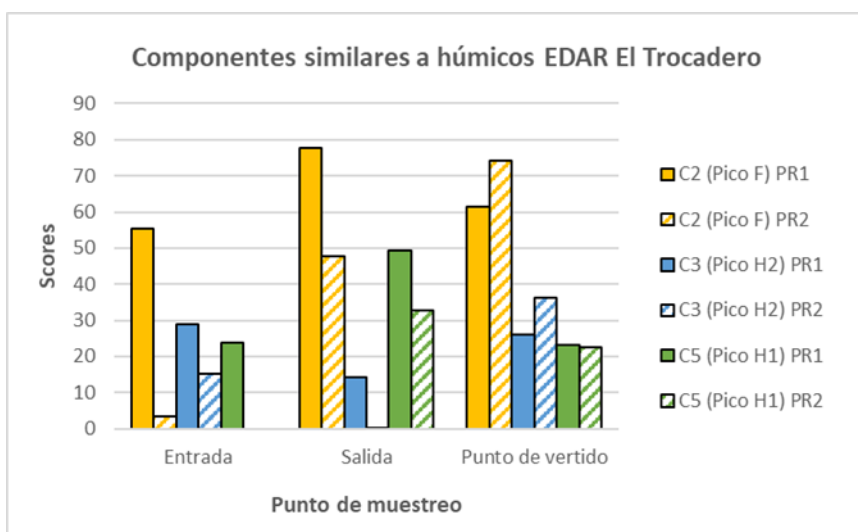


Figura 25 Peso de los componentes similares a húmicos en cada etapa del sistema de depuración y en el punto de vertido de la EDAR El Trocadero.

- C1 (Pico Trp1) está asociado a las proteínas. C1 debería disminuir a lo largo del tratamiento de depuración si este se realiza correctamente (Reynolds y Ahmad, 1997; Reynolds, 2002), sino predominarán los picos similares a las proteínas, siendo el pico Trp1 (similar al triptófano) el que se encuentre con mayor intensidad (Reynolds y Ahmad, 1997). El C1 tiene un score de 75.01 y disminuye hasta un 69.41 en salida, y hasta un 35.82 en la zona de vertido. Esto es una disminución apenas de un 7.45% en la depuradora, y de un 52.25% en el punto de

vertido, esta insuficiente capacidad de depuración ya se obtuvo con los valores de DBO_5 ([Figura 13](#)).

- C2 (Pico F) se asocia con los húmicos. El pico F es común en ambientes marinos y oceánicos (Kowalczyk et al., 2009), por lo que es lógico que predomine en la zona de vertido ([Figura 24](#)).
- C3 (Pico H2) y C5 (Pico H1) se asocian a los húmicos, son resistentes a los tratamientos de depuración e incluso pueden aumentar (Yang et al. 2014b), en la [Figura 25](#) se observa que después del tratamiento primario aumenta el pico H1 en un 51.44%.
- C4 (Pico Trp2) está asociado con las proteínas. El pico Trp2 predomina a la entrada en el segundo muestreo, Baker (2004) concluyó que existen fuertes correlaciones entre el nitrato y la intensidad de fluorescencia similar al triptófano, por lo que podemos asociar este compuesto a la muestra de color rojizo la cual se ha observado en el [apartado 5.1](#) que contiene compuestos nitrogenados.
- C6 (Pico Tir1) se asocia a las proteínas, siendo el pico Tir1 particular de ambientes marinos. C6 se observa que es exclusivo del punto de vertido ([Figura 24](#)), ya que las intensidades obtenidas a lo largo del tratamiento de depuración son mínimas pudiendo descartar que pertenezca al agua residual.

En conclusión, en la EDAR El Trocadero predomina el C1 (pico Trp1) tanto a lo largo del sistema de depuración como en la salida (con porcentaje de reducción de un 7.45%), esto indica un mal funcionamiento del tratamiento de depuración. En cambio, en el punto de vertido predominan los picos asociados a los húmicos, lo que indica que el efluente contaminado no está generando episodios de contaminación en la zona de vertido.

5.2.2. EDAR Guadalete (Jerez de la Frontera)

Se han seleccionado del conjunto de datos, doce EEMs corregidas correspondientes a la entrada, el intermedio, la salida y la zona de vertido para la EDAR Guadalete ([Figura 26](#)):

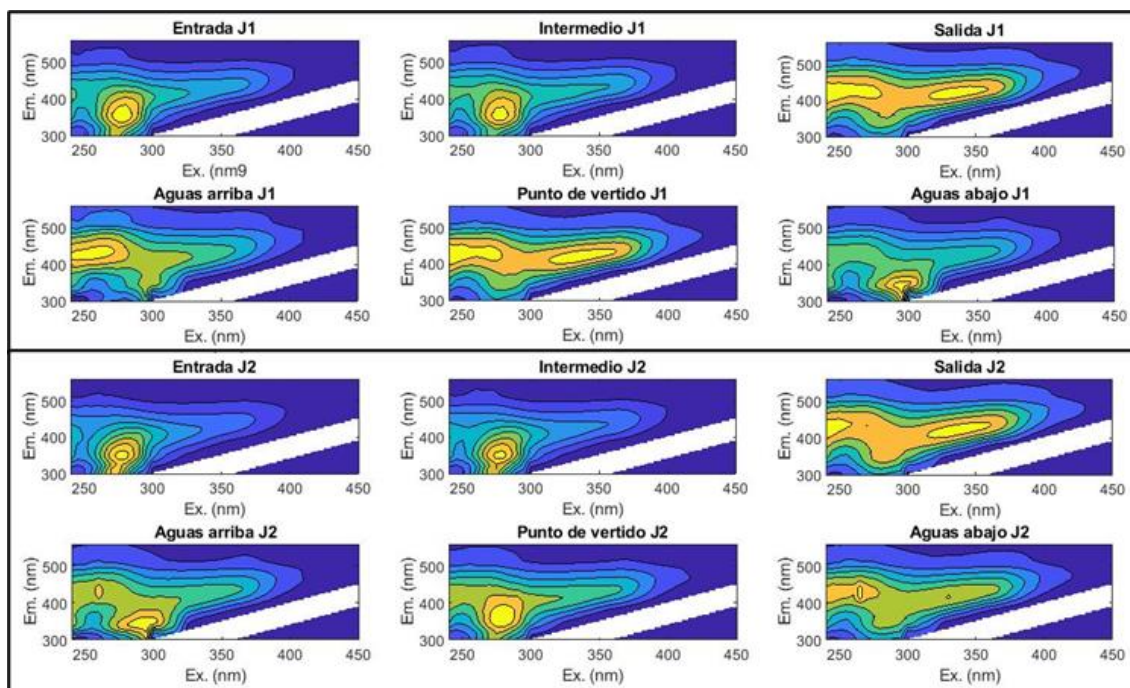


Figura 26 Gráfico con las EEMs corregidas representando el sistema de depuración y la zona de vertido de la EDAR Guadalete.

En la EDAR Guadalete se observa como el tratamiento secundario elimina los compuestos asociados a las proteínas ($MODF_A$), pasando a predominar los compuestos asociados a los húmicos ($MODF_H$), ya que las EEMs se van modificando a medida que avanza el tratamiento de depuración (Fig. 26: Filas 1 y 3), por lo que esto es indicativo de que el tratamiento de depuración se está realizando correctamente.

En aguas naturales sin contaminar predominan los picos asociados a los húmicos (Hudson et al., 2007), es decir, los picos de la zona $MODF_H$ son los que deberían predominar tanto aguas arriba como aguas abajo del punto de vertido, esto nos indicaría que el río no está contaminado.

En la primera toma de muestras se observa tanto para el punto de vertido como aguas arriba (Fig. 26: Punto de vertido J1 y Aguas arriba J1) intensidades de fluorescencia esperables. En cambio, aguas abajo (Fig. 26: Aguas abajo J1) predominan los picos de la zona $MODF_A$, esto es indicativo de que pueden existir un evento de contaminación, que puede deberse a que días anteriores de la toma de muestras hubo fuertes episodios de lluvia intensa, y cuando esto ocurre las EDARs vierten ARUs sin depurar por los aliviaderos, por lo que ese exceso de MOD disuelta vertida se ha podido quedar acumulada en la zona donde se tomó la muestra.

Por otro lado, en la segunda toma de muestras se observa como en el punto de vertido (Fig. 26: Punto de vertido J2) predominan los picos similares a las proteínas, esto no es lo esperable ya que se ha observado una correcta depuración (Fig. 26: Salida J2), pero observando las intensidades aguas arriba de vertido (Fig. 26: Aguas arriba J2) podemos suponer que se ha producido un evento puntual de contaminación o es material proteico generado por otras fuentes, de hecho, aguas abajo del punto de vertido (Fig. 26: Aguas abajo J2) se observa como empiezan a predominar los picos similares a los húmicos.

En la Figura 27 se muestran los picos máximos de intensidad de fluorescencia para los cinco componentes obtenidos para la EDAR Guadalete, en la Tabla 5 se muestran los máximos de excitación y emisión para cada uno de los componentes, y en la Figura 28 se han representado los cinco componentes indicando los diferentes picos que se les asocian.

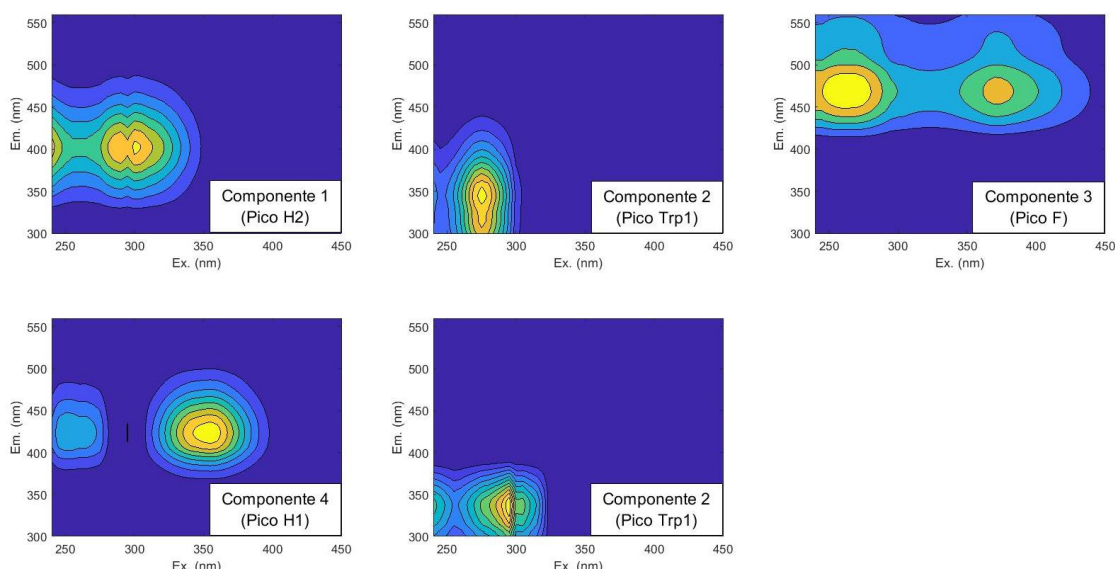


Figura 27 Gráfico de “huellas dactilares” de 5 componentes para la EDAR Guadalete

Tabla 5 Máximos de excitación y emisión de cada componente determinado por el análisis PARAFAC para la EDAR Guadalete

Componente	Máximo Ex / Máximo Em
C1 (Pico H2)	300/403
C2 (Pico Trp1)	275/341
C3 (Pico F)	260/468
C4 (Pico H1)	350/422

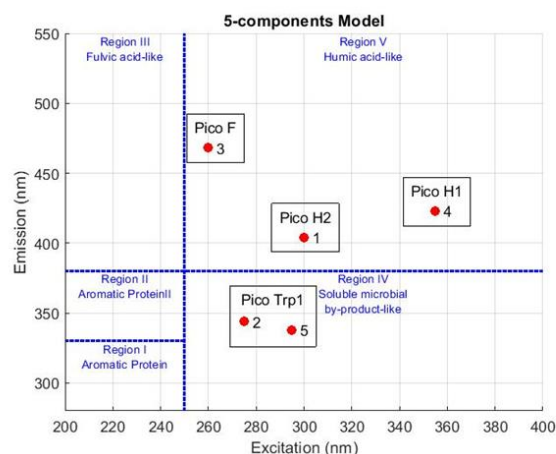


Figura 28 Mapa de 5 componentes con sus picos correspondientes para la EDAR Guadalete.

Tras el análisis PARAFAC se han obtenido cinco componentes específicos para la EDAR Guadalete, pero después de una revisión del procedimiento realizado se ha concluido que los componentes 2 y 5 son el mismo. Al realizar las correcciones se ha observado un pliegue en “huella dactilar” obtenida en el último componente (se puede observar en la [Figura 27](#)) que ha provocado que identifique a dos componentes distintos al generar en ese punto una mayor intensidad de fluorescencia. Para solucionar esto, se han unido las dos intensidades dejando un solo componente, por lo tanto, para la EDAR Guadalete se han obtenido cuatro componentes de los cuales uno se ha relacionado con sustancias de tipo proteico (C2) y tres con sustancias de tipo húmicas (C1, C3 y C4):

- El componente 1 (C1) se encuentra en la zona de los compuestos similares a húmicos, en concreto, donde se define el pico asociado al húmico (pico H2).
- El componente 2 (C2) se encuentra en la zona de los compuestos similares a proteínas, en concreto, donde se define el pico asociado al triptófano (pico Trp1).
- El componente 3 (C3) se encuentra en la zona de los compuestos similares a húmicos, en concreto, donde se define el pico asociado al fúlvico (pico F).
- El componente 4 (C4) se encuentra en la zona de los compuestos similares a húmicos, en concreto, donde se define el pico asociado al húmico (pico H1).

Una vez identificados los cuatro componentes obtenidos con el análisis PARAFAC, se han representado los scores (puntuaciones) de cada componente para cada punto de muestreo realizado, para visualizar y evaluar la evolución de estos componentes a lo largo del tratamiento de depuración y en la zona de vertido (Figuras [29](#) y [30](#)):

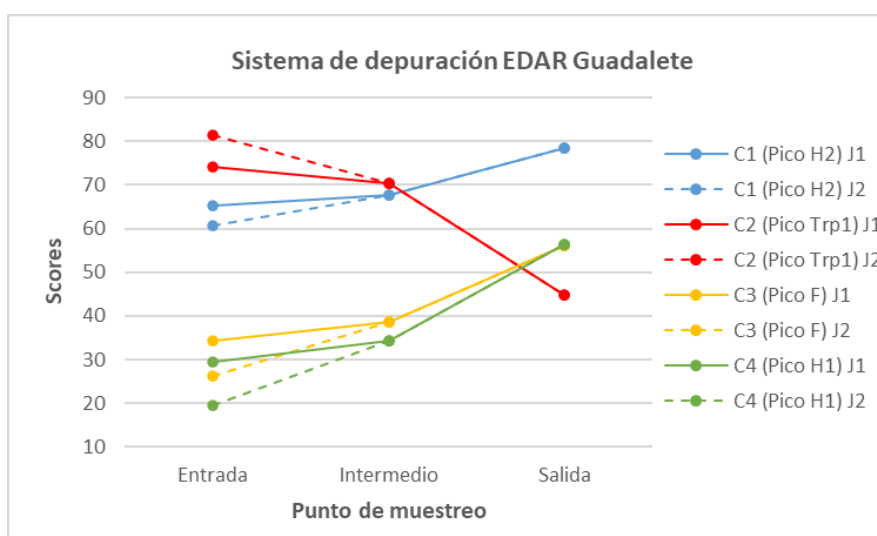


Figura 29 Evolución de los 4 componentes durante el sistema de depuración de la EDAR Guadalete.

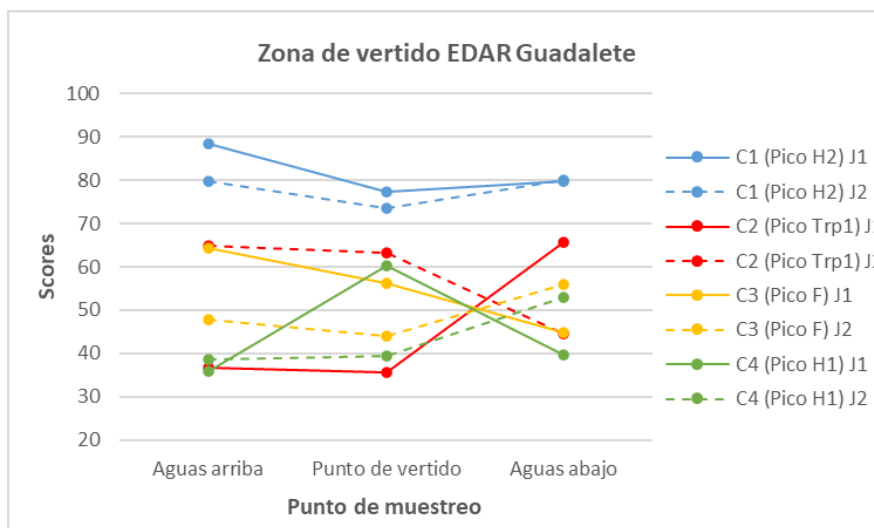


Figura 30 Evolución de los 4 componentes en el punto de vertido de la EDAR El Guadalete.

- C2 (pico Trp1) se relaciona directamente con el crecimiento microbiano (Cammack et al., 2004; Elliott et al. 2006), por ello, este pico debe disminuir considerablemente después del tratamiento secundario. Esta tendencia se observa en la [Figura 29](#), el C2 se reduce en un 39.72% en la depuradora y en un 51.92% en el punto de vertido, esta capacidad de depuración ya se obtuvo con los valores de DBO₅ ([Figura 13](#)). El pico Trp1 se puede utilizar para identificar eventos de contaminación (Reynolds, 2003), en la zona de vertido ([Figura 30](#)): como se observó en la [Figura 26](#), en la primera toma de muestras aguas abajo se puede interpretar como un episodio de contaminación o un aporte de material proteico de otras fuentes, al igual que en el punto de vertido y aguas arriba en la segunda toma de muestras (explicación de lo que ha podido ocurrir en los resultados de la [Figura 26](#)).
- C1 (pico H2), C3 (pico F) y C4 (pico H1) están asociados a las sustancias húmicas. De acuerdo a Cohen et al. (2014), el tratamiento secundario aumenta la MOD similar a la húmica, esto se observa en la [Figura 29](#) ya que C1, C3 y C4 aumentan una media de un 19.76, 46.21 y 56.65%, respectivamente después del segundo tratamiento. El agua sin contaminar está compuesta por sustancias húmicas (Hudson et al., 2007), por lo que en las zonas donde predomina el pico Trp1 (aportes antropogénicos) tienden a disminuir los componentes asociados a los húmicos (Baker y Spencer, 2004).

En conclusión, en la EDAR Guadalete, tanto a la salida como en el punto de vertido, predomina el C1 (pico H2), esto es indicador de un correcto funcionamiento del

tratamiento de depuración (con porcentaje de reducción de un 39.72%), y de que el efluente no está generando episodios de contaminación en la zona de vertido.

5.2.3. EDAR El Torno (Chiclana de la Frontera)

Se han seleccionado del conjunto de datos, catorce EEMs corregidas correspondientes a la entrada, los intermedios, la salida y la zona de vertido para la EDAR El Torno (Figura 31):

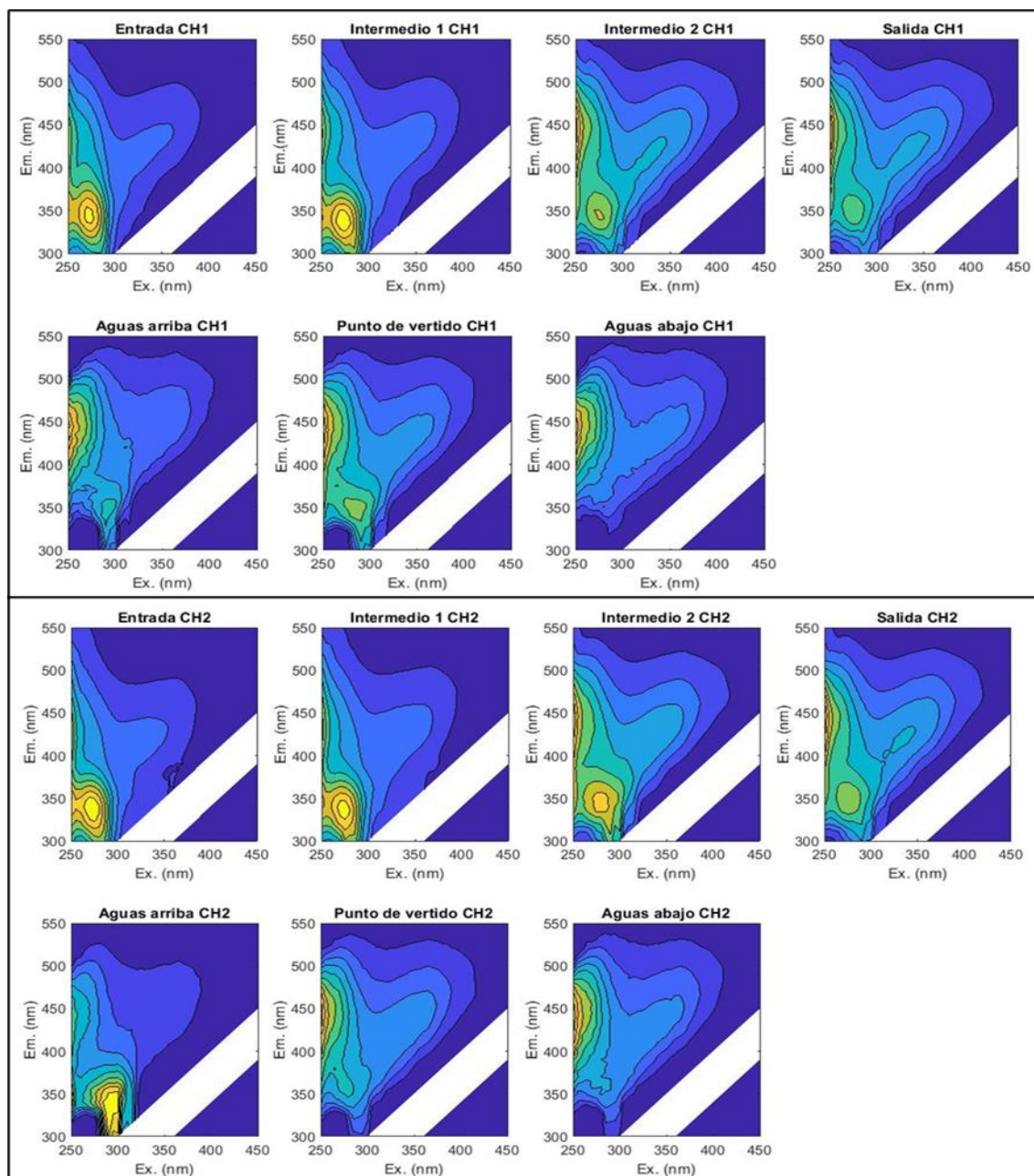


Figura 31 Gráfico con las EEMs corregidas representando el sistema de depuración y la zona de vertido de la EDAR El Torno.

En la EDAR El Torno se observa como el tratamiento secundario elimina considerablemente los compuestos asociados a las proteínas pasando a predominar los

compuestos asociados a los húmicos ([Fig. 31](#): Intermedios 1 y 2 CH1 y CH2), esto es indicativo de que el tratamiento de depuración se está realizando correctamente.

En la primera toma de muestras se observa tanto para el punto de vertido como aguas arriba ([Fig. 31](#): Punto de vertido CH1 y Aguas arriba CH1) intensidades de fluorescencia con predominancia de picos de la zona MODF_H, aunque también se observan picos de la zona MODF_A, esto indica que puede existir algún aporte antropogénico o material proteico de otras fuentes. En cambio, aguas abajo del punto de vertido ([Fig. 31](#): Aguas abajo CH1) predominan los picos de la zona MODF_A, por lo que si existe algún aporte antropogénico el río lo estaría asimilando correctamente.

Por otro lado, en la segunda toma de muestras se observa que tanto en el punto de vertido como aguas abajo ([Fig. 31](#): Punto de vertido CH2 y Aguas abajo CH2) predominan los picos similares a los húmicos, esto es indicativo de que el río está asimilando el vertido de ARU. Aguas arriba del punto de vertido ([Fig. 31](#): Aguas arriba CH2) predominan los picos similares a las proteínas, puede ser debido a un aporte de material proteico que proviene de otras fuentes o por un evento puntual contaminación se da por causas externas a la depuradora ya que sólo se observa en esa muestra y no afecta al resto de la zona de vertido.

En la [Figura 32](#) se muestran los picos máximos de intensidad de fluorescencia para los cinco componentes obtenidos para la EDAR El Torno, en la [Tabla 6](#) se muestran los máximos de excitación y emisión para cada uno de los componentes, y en la [Figura 33](#) se han representado los cinco componentes indicando los diferentes picos que se les asocian.

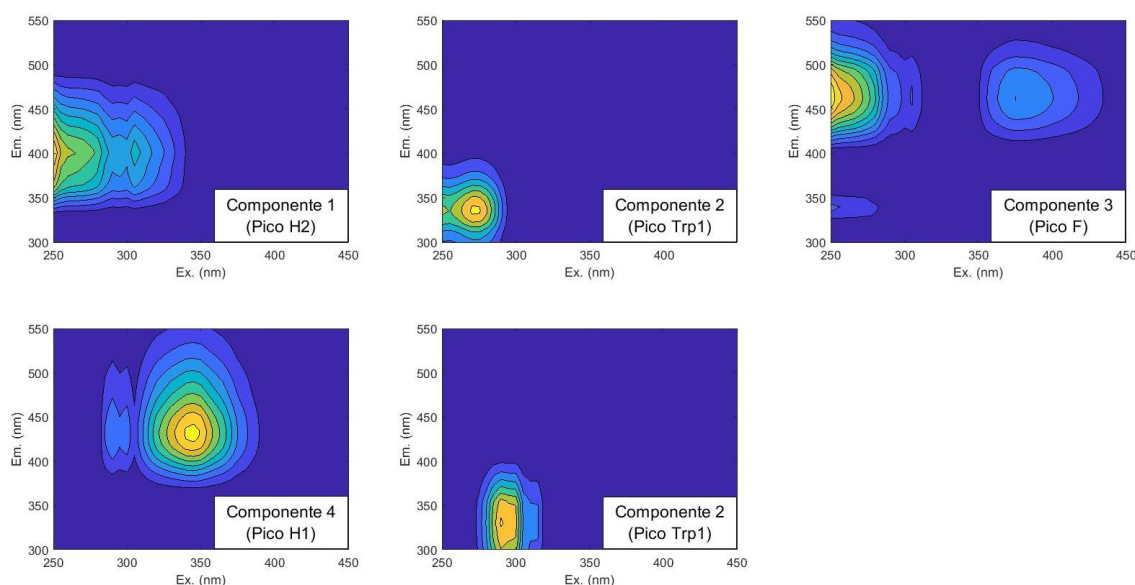


Figura 32 Gráfico de “huellas dactilares” de 5 componentes para la EDAR El Torno.

Tabla 6 Máximos de excitación y emisión de cada componente determinado por el análisis PARAFAC para la EDAR El Torno

Componente	Máximo Ex / Máximo Em
C1 (Pico H2)	250/405
C2 (Pico Trp1)	270/335
C3 (Pico F)	250/465
C4 (Pico H1)	345/430

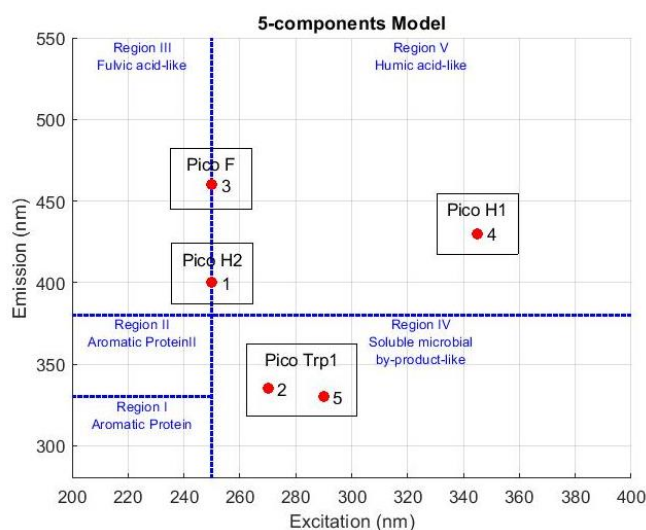


Figura 33 Mapa de 5 componentes con sus picos correspondientes para la EDAR El Torno.

Tras el análisis PARAFAC se han obtenido cinco componentes específicos para la EDAR El Torno, pero para los componentes C2 y C5 ha ocurrido lo mismo que en la EDAR Guadalete, por lo que se han unido las dos intensidades dejando un solo componente, por lo tanto, para la EDAR El Torno se han obtenido cuatro componentes específicos de los cuales uno se ha relacionado con sustancias de tipo proteico (C2) y tres con sustancias de tipo húmicas (C1, C3 y C4):

- El componente 1 (C1) se encuentra en la zona de los compuestos similares a húmicos, en concreto, donde se define el pico asociado al húmico (pico H2).
- El componente 2 (C2) se encuentra en la zona de los compuestos similares a proteínas, en concreto, donde se define el pico asociado al triptófano (pico Trp1).
- El componente 3 (C3) se encuentra en la zona de los compuestos similares a húmicos, en concreto, donde se define el pico asociado al fúlvico (pico F).
- El componente 4 (C4) se encuentra en la zona de los compuestos similares a húmicos, en concreto, donde se define el pico asociado al húmico (pico H1).

Una vez identificados los cuatro componentes obtenidos con el análisis PARAFAC, se han representado los scores (puntuaciones) de cada componente para cada punto de muestreo realizado, para visualizar y evaluar la evolución de estos componentes a lo largo del tratamiento de depuración y en la zona de vertido (Figuras 34 y 35):

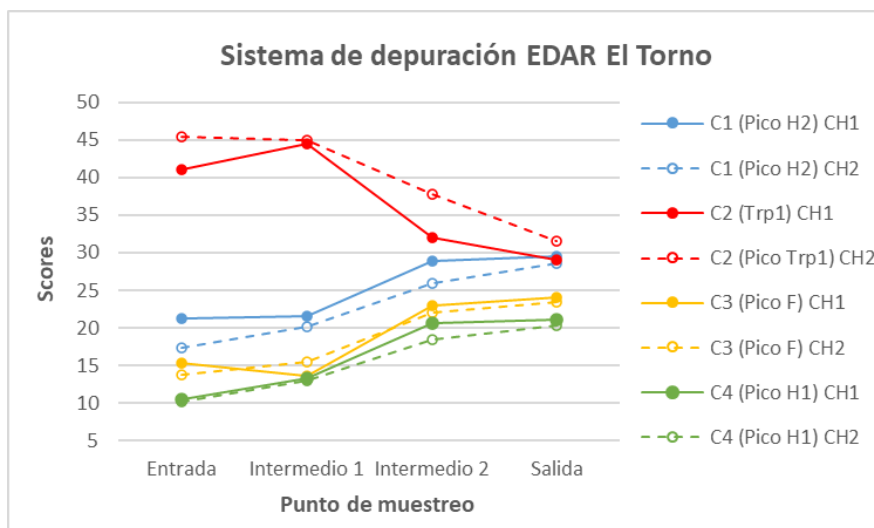


Figura 34 Evolución de los 4 componentes durante el sistema de depuración de la EDAR El Torno.

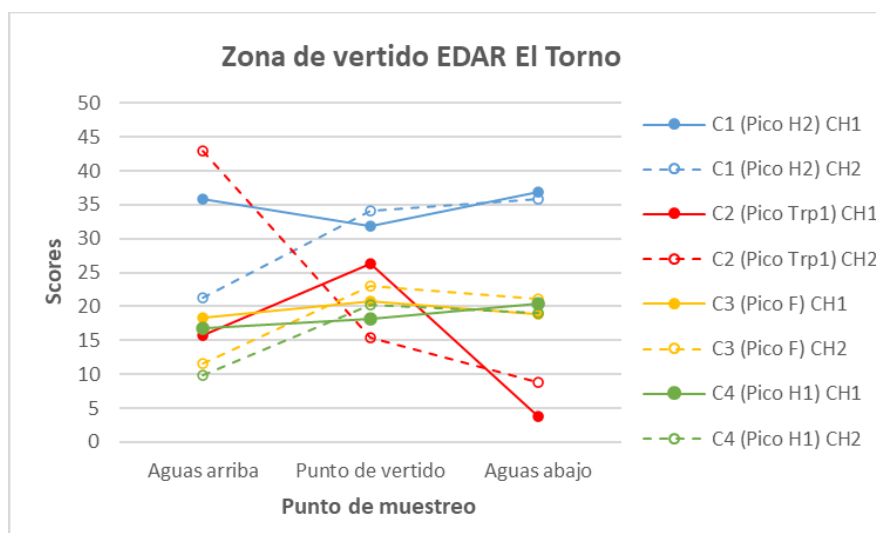


Figura 35 Evolución de los 4 componentes en el punto de vertido de la EDAR El Torno.

- C2 (pico Trp1), el cual se asocia con las proteínas, disminuye a lo largo del sistema de depuración (Figura 34), lo que indica que se ha realizado un tratamiento de depuración adecuado, el C2 se reduce en un 30.71% en la depuradora y en un 66.19% en el punto de vertido, esta capacidad de depuración ya se obtuvo con los valores de DBO₅ (Figura 13). Aguas abajo (Figura 35) se observa una disminución media de un 63.95 % con respecto al punto de vertido, esto indica que el río está asimilando el efluente de la depuradora. También destaca la concentración de C2 aguas arriba en el segundo muestreo, esto puede indicar que se ha producido un aporte antropogénico o de material proteico puntual en el río.
- C1 (pico H2), C3 (pico F) y C4 (pico H1), los cuales se asocian a los húmicos, aumentan a lo largo del tratamiento de depuración una media de un 33.60, 38.69 y 49.90 %, respectivamente. Wang et al. (2017) concluyeron que cuanto mayor es

la concentración relativa del pico húmico (pico H2) en comparación con el proteico (pico Trp1), menor es el nivel de contaminación en las muestras, esto se refleja en la [Figura 35](#), donde C1 predomina frente a C2, indicando que el efluente no genera episodios de contaminación en la zona de vertido.

En conclusión, en la EDAR El Torno disminuye el C2 (pico Trp1) a lo largo del sistema de depuración lo que indica un correcto funcionamiento del tratamiento de depuración (con porcentaje de reducción de un 30.71%), mientras que, en el punto de vertido, predomina el C1 (pico H2), esto es indicador de que el efluente no está generando episodios de contaminación en la zona de vertido.

6. CONCLUSIONES

En el presente TFG se ha analizado el rendimiento de depuración, así como el impacto del efluente en la zona de vertido en tres EDARs con características diferentes dentro de la provincia de Cádiz. Aparte de los parámetros establecidos en la legislación se han analizado matrices de excitación-emisión de fluorescencias (EEMs) con el fin de obtener una caracterización de la MOD. En base a los resultados obtenidos, se exponen a continuación las principales conclusiones alcanzadas:

- Según los criterios para los parámetros establecidos en el Anexo I del Real Decreto 509/1996 para el vertido de aguas residuales, se ha obtenido que las EDARs Guadalete y El Torno cumplen los requisitos de calidad de vertido, mientras que la EDAR El Trocadero no dispone de un tratamiento adecuado que cumpla con estos requisitos.
- Tras el análisis EEM-PARAFAC se obtuvieron seis, cuatro y cuatro componentes específicos para las EDARs El Trocadero, Guadalete y El Torno, respectivamente. En la EDAR El Trocadero tres componentes se han relacionado con picos similares a las proteínas (Trp1, Trp2 y Tir1) y los otros tres con picos similares a compuestos húmicos (F, H1 y H2). En las EDARs Guadalete y El Torno uno se ha relacionado con picos similares a las proteínas (Trp1) y los otros tres con picos similares a los húmicos (F, H1 y H2). Los resultados demuestran que con EEM-PARAFAC se puede caracterizar la MODF de las ARUs.
- En las EDARs Guadalete y El Torno, los tratamientos secundario y terciario redujeron la concentración de los componentes con picos proteicos, en concreto, el triptófano (Trp1) una media de un 36.16%, y aumentaron los componentes con picos húmicos (F, H1 y H2) una media de un 40.80%. Por lo tanto, el pico Trp1 se puede establecer como un indicador de la eficacia del tratamiento de depuración, mientras que los picos húmicos se pueden asociar a aguas naturales, depuradas o con pocos aportes de contaminación.
- La obtención del componente con pico Trp2 en el segundo muestreo de la EDAR El Trocadero demuestra la capacidad de esta técnica para identificar componentes anómalos en las ARUs.
- En las ARUs predominan los picos similares al triptófano (picos Trp1 y Trp2), mientras que en aguas no contaminadas predominan los picos similares a los húmicos (picos F, H1 y H2), este hecho podría establecer una característica

específica para identificar episodios de contaminación en aguas naturales provocadas por los efluentes de las depuradoras.

- Se puede establecer que con EEM-PARAFAC es posible caracterizar y realizar el seguimiento de la MODF a lo largo del sistema de depuración de ARUs y, posteriormente, en la zona de vertido, cumpliendo así con el objetivo general y la hipótesis planteada.
- Por otro lado, se debe tener en cuenta algunos aspectos a mejorar del análisis EEM-PARAFAC, ya que los resultados sugieren que pueden aparecer anomalías en las correcciones, lo que provocan la generación de varios componentes cuando las intensidades de fluorescencia pertenecen a un solo componente específico. Por otro lado, en casos puntuales, se pueden asociar concentraciones relativas a los componentes que no les corresponden. Aunque estos aspectos podrían solventarse analizando un mayor número de matrices, se concluye que la técnica EEM-PARAFAC es conveniente aplicarla como una técnica complementaria para profundizar o respaldar los valores estándares asociados a ARUs.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Amaral, V., Romera-Castillo, C., and Forja, J. (2020). Dissolved Organic Matter in the Gulf of Cádiz: Distribution and Drivers of Chromophoric and Fluorescent Properties. *Frontiers in Marine Science*, 7, 126. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.00126>
- Andersen, C. M., and Bro, R. (2003). Practical aspects of PARAFAC modeling of fluorescence excitation-emission data. In *Journal of Chemometrics* (Vol. 17, Issue 4, pp. 200–215). <https://doi.org/10.1002/cem.790>
- Ashraf, M. A., Mahmood, K., Maah, M. J., Yusoff, I., and Gharibreza, M. (2010). Effects of polluted water irrigation on environment and health of people in Jamber, District Kasur, Pakistan. *International Journal of Basic and Applied Sciences*, 10(3):37-57
- Baker, A. (2001). Fluorescence excitation - Emission matrix characterization of some sewage-impacted rivers. *Environmental Science and Technology*, 35(5), 948–953. <https://doi.org/10.1021/es000177t>
- Baker, A. (2002). Fluorescence excitation-emission matrix characterization of river waters impacted by a tissue mill effluent. *Environmental Science and Technology*, 36(7), 1377–1382. <https://doi.org/10.1021/es0101328>
- Baker, A., Cumberland, S. A., Bradley, C., Buckley, C., and Bridgeman, J. (2015). To what extent can portable fluorescence spectroscopy be used in the real-time assessment of microbial water quality? *Science of the Total Environment*, 532, 14–19. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.05.114>
- Baker, A., and Inverarity, R. (2004). Protein-like fluorescence intensity as a possible tool for determining river water quality. *Hydrological Processes*, 18(15), 2927–2945. <https://doi.org/10.1002/hyp.5597>
- Baker, A., and Spencer, R. G. M. (2004). Characterization of dissolved organic matter from source to sea using fluorescence and absorbance spectroscopy. *Science of the Total Environment*, 333(1–3), 217–232. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.04.013>
- BOE.es - BOE-A-1995-27963 Real Decreto-ley 11/1995, de 28 de diciembre, por el que se establecen las normas aplicables al tratamiento de las aguas residuales urbanas. (1995). From <https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-1995-27963>
- BOE.es - BOE-A-1996-7159 Real Decreto 509/1996, de 15 de marzo, de desarrollo del Real Decreto-ley 11/1995, de 28 de diciembre, por el que se establecen las normas aplicables al tratamiento de las aguas residuales urbanas. (1996). From

<https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=BOE-A-1996-7159>

BOE.es - BOE-A-2001-14276 *Real Decreto Legislativo 1/2001, de 20 de julio, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Aguas.* (2001). From

<https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-2001-14276>

BOE.es - BOE-A-2015-9806 *Real Decreto 817/2015, de 11 de septiembre, por el que se establecen los criterios de seguimiento y evaluación del estado de las aguas superficiales y las normas de calidad ambiental.* (2015). From

<https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=BOE-A-2015-9806>

BOE.es - DOUE-L-1998-80424 *Directiva 98/15/CE de la Comisión, de 27 de febrero de 1998, por la que se modifica la Directiva 91/271/CEE del Consejo en relación con determinados requisitos establecidos en su anexo I.* (1998). From

<https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=DOUE-L-1998-80424>

BOE.es - DOUE-L-2000-82524 *Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 23 de octubre de 2000, por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas.* (200). From

<https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=DOUE-L-2000-82524>

Bro, R. (1997). PARAFAC. Tutorial and applications. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 38(2), 149–171. [https://doi.org/10.1016/S0169-7439\(97\)00032-4](https://doi.org/10.1016/S0169-7439(97)00032-4)

Cammack, W. K. L., Kalff, J., Prairie, Y. T., and Smith, E. M. (2004). Fluorescent dissolved organic matter in lakes: Relationships with heterotrophic metabolism. *Limnology and Oceanography*, 49(6), 2034–2045.

<https://doi.org/10.4319/lo.2004.49.6.2034>

Coble, P. G. (2007). *Marine Optical Biogeochemistry: The Chemistry of Ocean Color.*

<https://doi.org/10.1021/cr050350>

Coble, P. G., Del Castillo, C. E., and Avril, B. (1998). Distribution and optical properties of CDOM in the Arabian Sea during the 1995 Southwest Monsoon. *Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 45(10–11), 2195–2223.

[https://doi.org/10.1016/S0967-0645\(98\)00068-X](https://doi.org/10.1016/S0967-0645(98)00068-X)

Cohen, E., Levy, G. J., and Borisover, M. (2014). Fluorescent components of organic matter in wastewater: Efficacy and selectivity of the water treatment. *Water Research*, 55, 323–334. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.02.040>

DBO/Respiración/Agotamiento OxiTop® Control OxiTop® IS 12 Oxi 197i inoLab® BSB/BOD 740 con StirrOx® G Determinación del biogás Respiración de suelos.

From: <http://www.ictsl.net/downloads/oxitop.pdf>

Decreto 109/2015, de 17 de marzo, por el que se aprueba el Reglamento de Vertidos al Dominio Público Hidráulico y al Dominio Público Marítimo-Terrestre de Andalucía. (2015). From <https://www.juntadeandalucia.es/boja/2015/89/3>

Decreto 204/2005, de 27 de septiembre, por el que se declaran las zonas sensibles y normales en las aguas de transición y costeras y de las cuencas hidrográficas intracomunitarias gestionadas por la Comunidad Autónoma de Andalucía. (2005). From <https://www.juntadeandalucia.es/boja/2005/208/5>

Directiva 91/271/CEE sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas Manual de interpretación y elaboración de informes. (1991). From: https://www.miteco.gob.es/es/agua/publicaciones/03_Manual_Directiva_91_271_CEE_tcm30-214069.pdf

Dittmar, T., and Stubbins, A. (2013). Dissolved Organic Matter in Aquatic Systems. In *Treatise on Geochemistry: Second Edition* (Vol. 12, pp. 125–156). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-095975-7.01010-X>

Elliott, S., Lead, J. R., and Baker, A. (2006). Thermal quenching of fluorescence of freshwater, planktonic bacteria. *Analytica Chimica Acta*, 564(2), 219–225. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.01.087>

Felipe-Sotelo, M., Andrade, J. M., Carlosena, A., and Tauler, R. (2007). Temporal characterisation of river waters in urban and semi-urban areas using physico-chemical parameters and chemometric methods. *Analytica Chimica Acta*, 583(1), 128–137. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.10.011>

Galapate, R. P., Baes, A. U., Ito, K., Mukai, T., Shoto, E., and Okada, M. (1998). Detection of domestic wastes in Kurose River using synchronous fluorescence spectroscopy. *Water Research*, 32(7), 2232–2239. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(97\)00426-0](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(97)00426-0)

Ghosh, K., and Schnitzer, M. (1980). Fluorescence excitation spectra of humic substances. *Canadian Journal of Soil Science*, 60(2), 373–379. <https://doi.org/10.4141/cjss80-040>

González, S., Petrovic, M., and Barceló, D. (2007). Removal of a broad range of surfactants from municipal wastewater - Comparison between membrane bioreactor and conventional activated sludge treatment. *Chemosphere*, 67(2), 335–343. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.09.056>

Henderson, R. K., Baker, A., Murphy, K. R., Hambly, A., Stuetz, R. M., and Khan, S. J.

- (2009). Fluorescence as a potential monitoring tool for recycled water systems: A review. In *Water Research* (Vol. 43, Issue 4, pp. 863–881). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.11.027>
- Hershberger, L. W., Callis, J. B., and Christian, G. D. (1981). Liquid Chromatography with Real-Time Video Fluorometric Monitoring of Effluents. *Analytical Chemistry*, 53(7), 971–975. <https://doi.org/10.1021/ac00230a011>
- Informe mundial de las Naciones Unidas sobre el desarrollo de los recursos hídricos, 2017: Aguas residuales: el recurso no explotado - UNESCO Biblioteca Digital.* (2017). From <https://unesdoc.unesco.org/ark:/48223/pf0000247647>
- Janhom, T., Wattanachira, S., and Pavasant, P. (2009). Characterization of brewery wastewater with spectrofluorometry analysis. *Journal of Environmental Management*, 90(2), 1184–1190. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2008.05.008>
- JenwayTM Espectrofotómetro de haz único UV/Visible modelo 7315 Modelo: 7315 Espectrofotómetros / Fisher Scientific. From <https://www.fishersci.es/shop/products/jenway-model-7315-uv-visible-single-beam-spectrophotometer/15179702>
- Kalbitz, K., Geyer, S., and Geyer, W. (2000). A comparative characterization of dissolved organic matter by means of original aqueous samples and isolated humic substances. *Chemosphere*, 40(12), 1305–1312. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(99\)00238-6](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(99)00238-6)
- Kallir, A. J. (1986). Total luminescence spectroscopy. <https://doi.org/10.3929/ethz-a-000415308>
- Kaushal, S. S., Groffman, P. M., Band, L. E., Elliott, E. M., Shields, C. A., and Kendall, C. (2011). Tracking nonpoint source nitrogen pollution in human-impacted watersheds. *Environmental Science and Technology*, 45(19), 8225–8232. <https://doi.org/10.1021/es200779e>
- Khamis, K., Sorensen, J. P. R., Bradley, C., Hannah, D. M., Lapworth, D. J., and Stevens, R. (2015). In situ tryptophan-like fluorometers: Assessing turbidity and temperature effects for freshwater applications. *Environmental Sciences: Processes and Impacts*, 17(4), 740–752. <https://doi.org/10.1039/c5em00030k>
- Kowalczyk, P., Durako, M. J., Young, H., Kahn, A. E., Cooper, W. J., and Gonsior, M. (2009). Characterization of dissolved organic matter fluorescence in the South Atlantic Bight with use of PARAFAC model: Interannual variability. *Marine Chemistry*, 113(3–4), 182–196. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2009.01.015>
- Laane, R. W. P. M., and Koole, L. (1982). The relation between fluorescence and

- dissolved organic carbon in the Ems-Dollart estuary and the Western Wadden Sea. *Netherlands Journal of Sea Research*, 15(2), 217–227.
[https://doi.org/10.1016/0077-7579\(82\)90005-9](https://doi.org/10.1016/0077-7579(82)90005-9)
- Lee, Y., Hur, J., and Shin, K. H. (2014). Characterization and source identification of organic matter in view of land uses and heavy rainfall in the Lake Shihwa, Korea. *Marine Pollution Bulletin*, 84(1–2), 322–329.
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.04.033>
- Lyon, B. A., Cory, R. M., and Weinberg, H. S. (2014). Changes in dissolved organic matter fluorescence and disinfection byproduct formation from UV and subsequent chlorination/chloramination. *Journal of Hazardous Materials*, 264, 411–419.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.10.065>
- Mayer, L. M., Schick, L. L., and Loder, T. C. (1999). Dissolved protein fluorescence in two maine estuaries. *Marine Chemistry*, 64(3), 171–179.
[https://doi.org/10.1016/S0304-4203\(98\)00072-3](https://doi.org/10.1016/S0304-4203(98)00072-3)
- Micó, P., García-Ballesteros, S., Mora, M., Vicente, R., Amat, A. M., and Arques, A. (2019). EEMlab: A graphical user-friendly interface for fluorimetry experiments based on the drEEM toolbox. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 188, 6–13. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2019.03.001>
- Micó, Pau. (2021). EEMlab v026 tutorial. From: http://pabmitor.webs.upv.es/wp-content/uploads/EEMlab/docs/2104_EEMlab_v026_Appendix_A.pdf
- Ministerio de Medio Ambiente. *Manual para la gestión de vertidos* (2007). From https://www.miteco.gob.es/es/agua/publicaciones/Manual_para_la_gestion_de_vertidos_tcm30-137170.pdf
- Mostofa, K. M. G., Wu, F., Liu, C. Q., Fang, W. L., Yuan, J., Ying, W. L., Wen, L., and Yi, M. (2010). Characterization of Nanming River (southwestern China) sewerage-impacted pollution using an excitation-emission matrix and PARAFAC. *Limnology*, 11(3), 217–231. <https://doi.org/10.1007/s10201-009-0306-4>
- Multímetro MM 41 - Crison Instruments. From <http://www.crisoninstruments.com/es/laboratorio/multimetro/multimetro-de-sobremesa/multimetro-mm-41>
- Murphy, K. R., Stedmon, C. A., Graeber, D., and Bro, R. (2013). Fluorescence spectroscopy and multi-way techniques. PARAFAC. In *Analytical Methods* (Vol. 5, Issue 23, pp. 6557–6566). The Royal Society of Chemistry.
<https://doi.org/10.1039/c3ay41160e>

- Osburn, C. L., Handsel, L. T., Mikan, M. P., Paerl, H. W., and Montgomery, M. T. (2012). Fluorescence tracking of dissolved and particulate organic matter quality in a river-dominated estuary. *Environmental Science and Technology*, 46(16), 8628–8636. <https://doi.org/10.1021/es3007723>
- Peiris, R. H., Budman, H., Moresoli, C., and Legge, R. L. (2011). Identification of humic acid-like and fulvic acid-like natural organic matter in river water using fluorescence spectroscopy. *Water Science and Technology*, 63(10), 2427–2433. <https://doi.org/10.2166/wst.2011.439>
- Petrone, K. C., Fellman, J. B., Hood, E., Donn, M. J., and Grierson, P. F. (2011). The origin and function of dissolved organic matter in agro-urban coastal streams. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences*, 116(1), 1028. <https://doi.org/10.1029/2010JG001537>
- Radjenovic, J., Petrovic, M., and Barceló, D. (2007). Analysis of pharmaceuticals in wastewater and removal using a membrane bioreactor. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387(4), 1365–1377. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0883-6>
- Ramanujam, N. (2000). Fluorescence spectroscopy of neoplastic and non-neoplastic tissues. In *Neoplasia* (Vol. 2, Issues 1–2, pp. 89–117). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/sj.neo.7900077>
- Reynolds, D. M. (2002). The differentiation of biodegradable and non-biodegradable dissolved organic matter in wastewaters using fluorescence spectroscopy. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 77(8), 965–972. <https://doi.org/10.1002/jctb.664>
- Reynolds, D. M. (2003). Rapid and direct determination of tryptophan in water using synchronous fluorescence spectroscopy. *Water Research*, 37(13), 3055–3060. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(03\)00153-2](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(03)00153-2)
- Reynolds, D. M., and Ahmad, S. R. (1997). Rapid and direct determination of wastewater BOD values using a fluorescence technique. *Water Research*, 31(8), 2012–2018. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(97\)00015-8](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(97)00015-8)
- Rodríguez-Vidal, F. J., García-Valverde, M., Ortega-Azabache, B., González-Martínez, Á., and Bellido-Fernández, A. (2020). Characterization of urban and industrial wastewaters using excitation-emission matrix (EEM) fluorescence: Searching for specific fingerprints. *Journal of Environmental Management*, 263, 110396. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.110396>
- Spectrofluorometer FP-8300 Manual. From <https://www.jasco->

[spain.com/images/productos/espectroscopia/fluorescencia/Catalogo-FP-8000-Series.pdf](https://www.spain.com/images/productos/espectroscopia/fluorescencia/Catalogo-FP-8000-Series.pdf)

- Sinsabaugh, R. L., and Findlay, S. (2003). Dissolved Organic Matter. In *Aquatic Ecosystems* (pp. 479–498). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-012256371-3/50021-4>
- Smilde, A., Bro, R., and Geladi, P. (2005). Multi-way analysis with applications in the chemical sciences. In *Multi-way Analysis with Applications in the Chemical Sciences*. Wiley Blackwell. <https://doi.org/10.1002/0470012110>
- Soil Pollution - Misra, S. G. and Mani, D - Google Libros. (2009). From https://books.google.es/books?id=iFcSF0Vb1swC&printsec=frontcover&dq=soil+pollution&hl=es&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=Human%20health&f=true
- Stedmon, C. A., and Markager, S. (2005). Tracing the production and degradation of autochthonous fractions of dissolved organic matter by fluorescence analysis. *Limnology and Oceanography*, 50(5), 1415–1426. <https://doi.org/10.4319/lo.2005.50.5.1415>
- Tartakovsky, B., Lishman, L. A., and Legge, R. L. (1996). Application of multi-wavelength fluorometry for monitoring wastewater treatment process dynamics. *Water Research*, 30(12), 2941–2948. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(96\)00196-0](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(96)00196-0)
- Thư viện số Văn Lang: Industrial Water Pollution Control (3rd ed.). (2000). From http://thuvienso.vanlanguni.edu.vn/handle/Vanlang_TV/20613
- Vamshi, S., Madiraju, H., and Hung, Y.-T. (2018). Treatment of Disperse Blue 14 Wastewater and Sugar Wastewater By Low Cost Adsorbents CFPs. Special Issue on: "Sustainable Supply Chains and Environmental Policies on Waste Reduction: Challenges and Opportunities View project Advances in Environmental engineering View project. www.aelsindia.com/rjces.htm
- Vasel, J. L., and Praet, E. (2002). On the use of fluorescence measurements to characterize wastewater. *Water Science and Technology*, 45(4–5), 109–116. <https://doi.org/10.2166/wst.2002.0564>
- Wang, X., Zhang, F., Kung, H. te, Ghulam, A., Trumbo, A. L., Yang, J., Ren, Y., and Jing, Y. (2017). Evaluation and estimation of surface water quality in an arid region based on EEM-PARAFAC and 3D fluorescence spectral index: A case study of the Ebinur Lake Watershed, China. *Catena*, 155, 62–74. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2017.03.006>

- Yamashita, Y., and Tanoue, E. (2003). Chemical characterization of protein-like fluorophores in DOM in relation to aromatic amino acids. *Marine Chemistry*, 82(3–4), 255–271. [https://doi.org/10.1016/S0304-4203\(03\)00073-2](https://doi.org/10.1016/S0304-4203(03)00073-2)
- Yang, L., Han, D. H., Lee, B. M., and Hur, J. (2015). Characterizing treated wastewaters of different industries using clustered fluorescence EEM-PARAFAC and FT-IR spectroscopy: Implications for downstream impact and source identification. *Chemosphere*, 127, 222–228. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.02.028>
- Yang, L., Shin, H. S., and Hur, J. (2014). Estimating the concentration and biodegradability of organic matter in 22 wastewater treatment plants using fluorescence excitation emission matrices and parallel factor analysis. *Sensors (Switzerland)*, 14(1), 1771–1786. <https://doi.org/10.3390/s140101771>
- Yu, G. H., He, P. J., and Shao, L. M. (2010). Novel insights into sludge dewaterability by fluorescence excitation-emission matrix combined with parallel factor analysis. *Water Research*, 44(3), 797–806. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.10.021>
- Yu, H., Song, Y., Tu, X., Du, E., Liu, R., and Peng, J. (2013). Assessing removal efficiency of dissolved organic matter in wastewater treatment using fluorescence excitation emission matrices with parallel factor analysis and second derivative synchronous fluorescence. *Bioresource Technology*, 144, 595–601. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.07.025>

ANEXOS

Anexo I: Equipos utilizados

1. Medida de la demanda bioquímica de oxígeno (DBO₅): Figuras [I](#) y [II](#)



Figura I Botella Oxitop® con manómetro *Figura II Armario de incubación OxiTop®*
Fuentes: elaboración propia

2. Medida de la demanda química de oxígeno (DQO): [Figura III](#)



Figura III Termorreactor ECO25 marca VELP
Fuente: elaboración propia

3. Medida de los sólidos en suspensión (SS): [Figura IV](#)



Figura IV Bomba de succión, matraz Kitasato y embudo
Fuente: elaboración propia

4. Medida de pH y conductividad: [Figura V](#)



Figura V Multímetro Crison MM 41
Fuente: elaboración propia

5. Medida del carbono orgánico no purgable (NPOC) y Nitrógeno total (NT): [Figura VI](#)



Figura VI Total Organic Carbon Analyzer TOC-L CPH/CPN (marca SHIMADZU)
Fuente: elaboración propia

6. Medidas cromatógrafo iónico: [Figura VII](#)



Figura VII CI 882-Compact IC Plus 1 (Metrohm)
Fuente: elaboración propia

7. Medida de la absorbancia y del espectro de absorbancia UV-Visible: [Figura VIII](#)



Figura VIII Espectrofotómetro Jenway™ 7315
Fuente: elaboración propia

8. Medida de la fluorescencia: [Figura IX](#)



Figura IX36 Espectrofluorímetro JASCO FP-8300
Fuente: elaboración propia

Anexo II: Procedimiento realizado mediante la aplicación EEMlab

La aplicación EEMlab se ha instalado siguiendo el tutorial explicado en: <http://pabmitor.webs.upv.es/eemlab/>.

Para mostrar el procedimiento que se realiza con la aplicación EEMlab se han tomado los datos correspondientes a los dos muestreos de la EDAR Guadalete.

Los datos utilizados se pueden consultar y descargar en el siguiente enlace: <https://drive.google.com/drive/folders/1UOfngPy8oYf3ZBQPuWwl6iKzl9LzQSa3?usp=sharing>

I) Creación de un conjunto de datos de EEM corregido a partir de archivos de datos sin procesar:

a) **Importar los archivos de datos sin procesar (raw data files):** el primer paso es configurar el experimento con los equipos utilizados, en este caso, el espectrofotómetro utilizado es Jenway_7315 y el espectrofluorímetro utilizado es Jasco_FP8300.

1. Load → Configuration

2. Seleccionar todas las casillas que se muestran en la [Figura X](#) y darle a “Ok”.

Figura X Configuración de EEMlab para el conjunto de datos de ejemplo

b) **Importar un registro de muestra (sample log):** importar el archivo Excel creado con nuestros datos.

1. Load → Dataset → Metadata

2. Cargar el archivo que se encuentra en: MATLAB → Jerez → Sample log EDAR Jerez.xlsx // y le damos a “Abrir”

c) **Carga de muestras EEM:** cargar las matrices de excitación-emisión (EEMs).

1. Load → Dataset → EEM files

2. Seleccionar “EEMfile” en la [Figura XI](#) y pulsar “OK”

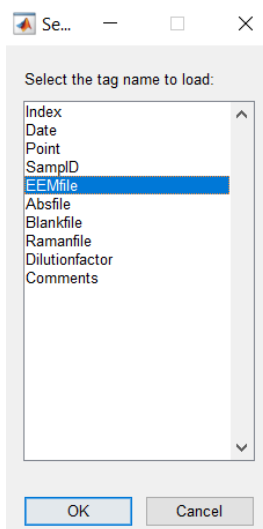


Figura XI Cuadro de selección y carga de los diferentes campos

3. En la carpeta “Jerez” pulsar la carpeta “EEMs” y darle a “Seleccionar carpeta”

4. Obtenemos la siguiente gráfica ([Figura XII](#)), mover la barra de debajo de la gráfica para ver las 30 observaciones que hay.

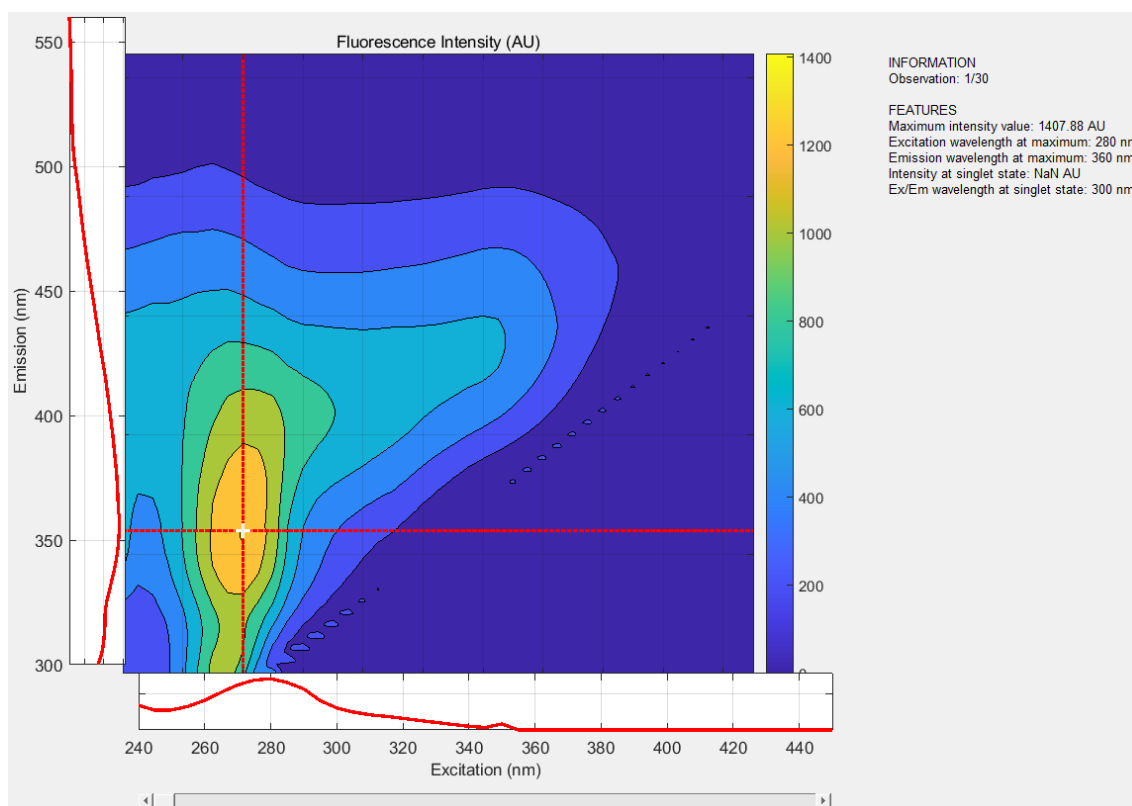


Figura XII (Izquierda) EEM de la muestra seleccionada, el valor máximo de intensidad y los escaneos de excitación y emisión con sus máximos. (Derecha) Información referida a las características de la EEM.

d) **Etiquetas para cada muestra:** cargar las características de cada muestra (fecha, lugar, punto, etc.).

1. Load → Dataset → Tags
2. Seleccionar en la [Figura XIII](#) “Index”, “Date”, “Point”, “SampID” y “comments”, y pulsar “OK”.

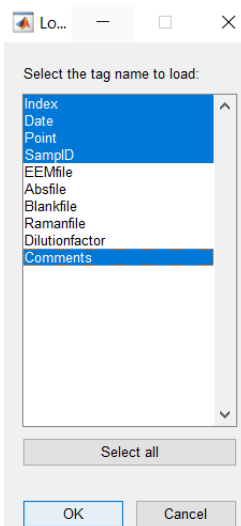


Figura XIII37 Cuadro de selección y carga de las etiquetas

3. Obtenemos la siguiente gráfica ([Figura XIV](#)), a la derecha de la gráfica se observa la información etiquetada con sus valores.

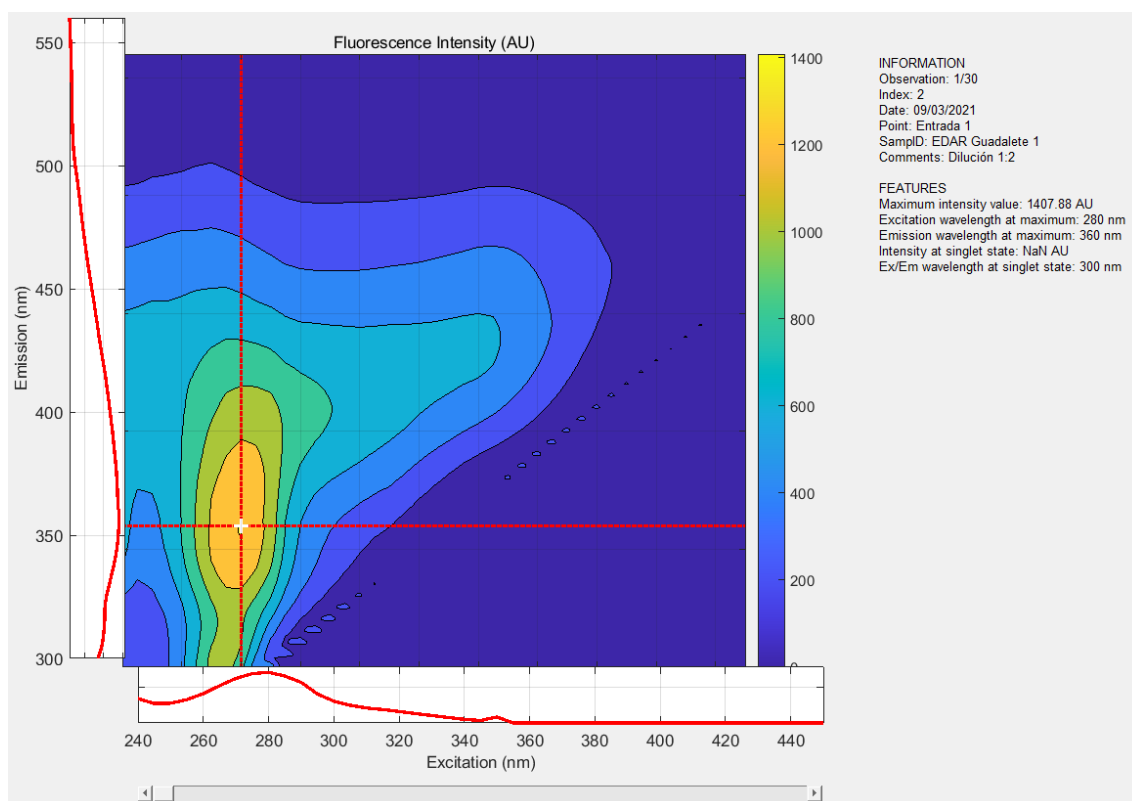


Figura XIV (Derecha) Información referida a las etiquetas cargadas.

e) **Corregir los archivos espectralmente (excitación y emisión)**: el equipo utilizado tiene corrección espectral automática, por lo que no necesitamos archivos de corrección de excitación y emisión.

f) **Corregir el efecto de filtro interno del fluorímetro (IFE: Inner Filter Effect) con escaneos de absorbancia**: cargar los datos de absorbancia para, posteriormente, corregir el efecto de filtro interno del fluorímetro en las EEMs.

1. Load → Corrections → Inner filter effect → Absorbance scans
2. Seleccionar en la [Figura XV](#) “Absfile” y pulsar “OK”.

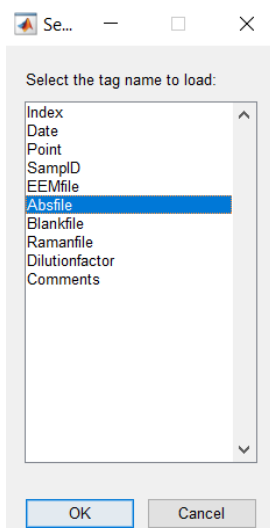


Figura XV Cuadro de selección y carga de los diferentes campos

3. En la carpeta “Jerez” pulsar la carpeta “Abs” y darle a “Seleccionar carpeta”

g) **Cargar blancos de EEM (miliQ) y factores de dilución**: cargar los datos de los blancos y los factores de dilución para, posteriormente, hacer estas correcciones en las EEMs.

1. Load → Corrections → Dataset dilution → Blanks
2. Seleccionar en la [Figura XVI](#) “BlankFile” y pulsar “OK”.

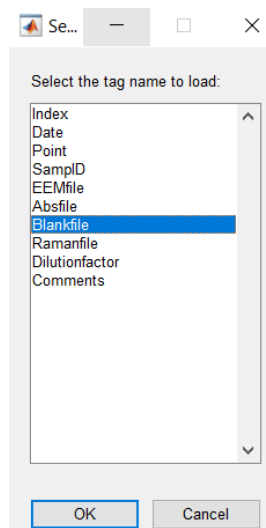


Figura XVI Cuadro de selección y carga de los diferentes campos

3. En la carpeta “Jerez” pulsar la carpeta “BLN” y darle a “Seleccionar carpeta”
4. Load → Corrections → Dataset dilution → Factors
5. Seleccionar en la [Figura XVII](#) “Dilutionfactor” y pulsar “OK”.

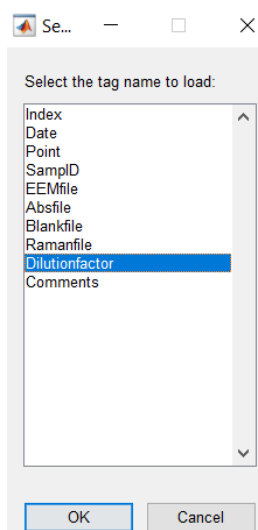


Figura XVII Cuadro de selección y carga de los diferentes campos

h) Cargar los escaneos Water Raman: cargar los datos de Raman para, posteriormente, hacer estas correcciones en las EEMs.

1. Load → Normalizations → Water Raman scans for dataset
2. Seleccionar en la [Figura XVIII](#) “RamanFile” y pulsar “OK”.

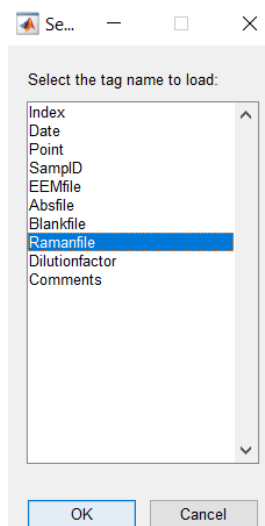


Figura XVIII Cuadro de selección y carga de los diferentes campos

3. En la carpeta “Jerez” pulsar la carpeta “RAM” y darle a “Seleccionar carpeta”

i) **Corrección de las muestras EEM**: corregir las EEMs con los archivos cargados anteriormente.

1. Dataset → Correct → Step 2: Inner filter effect

2. Sale la siguiente información ([Figura XIX](#)), pulsar “OK”, significa que el programa da por hecho que los espectros de excitación o emisión están corregidos automáticamente con el espectrofluorímetro.

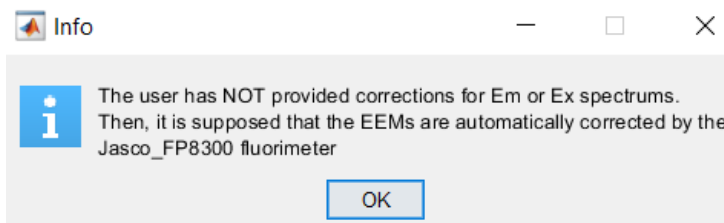


Figura XIX Cuadro de información

3. Repetir el punto 1 con: Step 3: Raman Normalizations y Step 4: Blank Subtraction

4. Añadir de nuevo las etiquetas (repetir el apartado 4: Load → Dataset → Tags)

5. Se obtiene el siguiente gráfico ([Figura XX](#)) después de las tres correcciones:

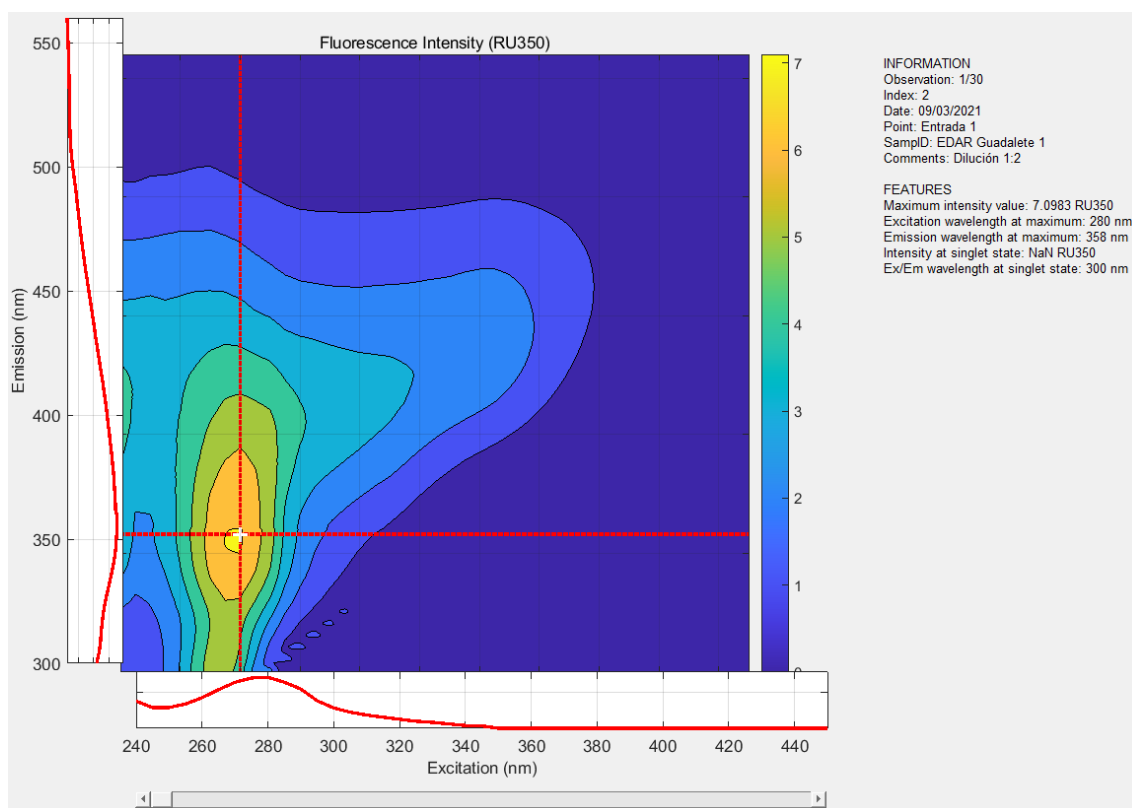


Figura XX Muestras de EEM corregidas

II) Análisis PARAFAC usando EEMlab

a) **Cambiar el tamaño del conjunto de datos:** visualizar el conjunto de datos y ver si es necesario cambiar el tamaño.

1. Plots → Dataset → Collection

2. En la [Figura XXI](#) seleccionar el número de filas (rows) y de columnas (columns) necesarias para visualizar el conjunto de datos.

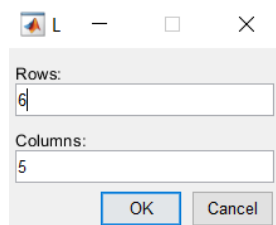


Figura XXI Seleccionar el número de filas y columnas para visualizar el conjunto de datos

3. Se obtienen los siguientes gráficos ([Figura XXII](#)), en este caso, no es necesario cambiar el tamaño del conjunto de datos.

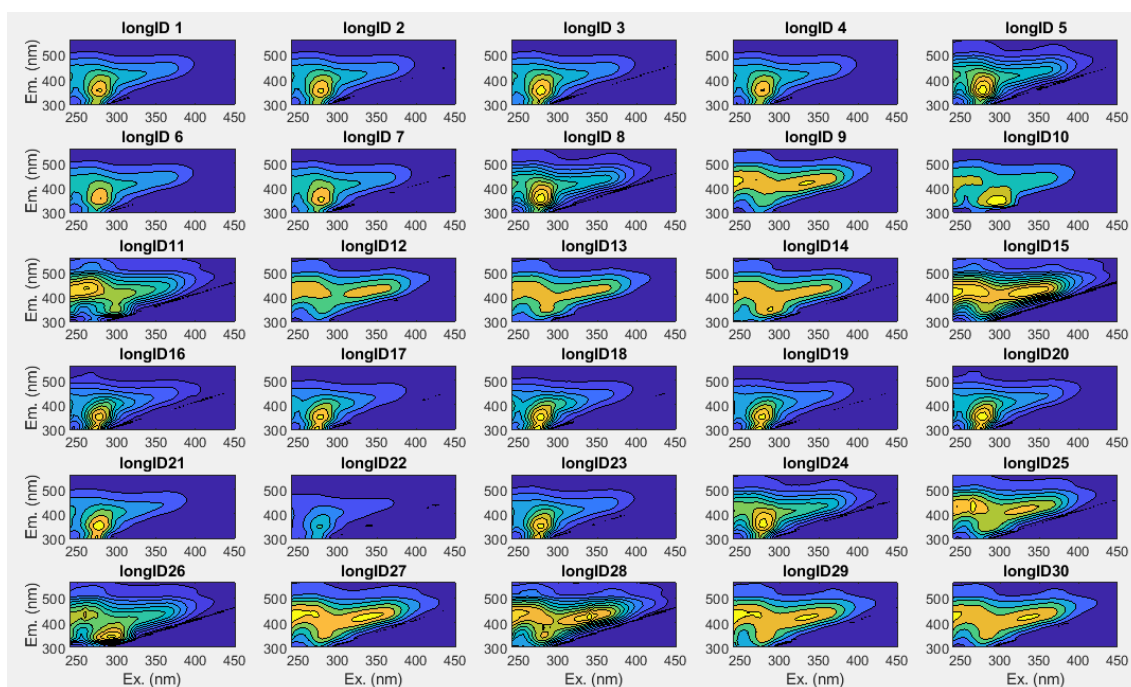


Figura XXII38 Visualización del conjunto de datos

b) Eliminar picos de dispersión: eliminar los picos de dispersión diagonal que afectan al modelado que se realiza mediante PARAFAC (Rayleigh y Raman).

1. Dataset → Remove scattering
2. En la [Figura XXIII](#) seleccionar los rangos necesarios para eliminar los picos de dispersión de Rayleigh y Raman.

Figura XXIII Detalles de las opciones para eliminar picos de dispersión

2. Se obtiene el siguiente gráfico ([Figura XXIV](#)):

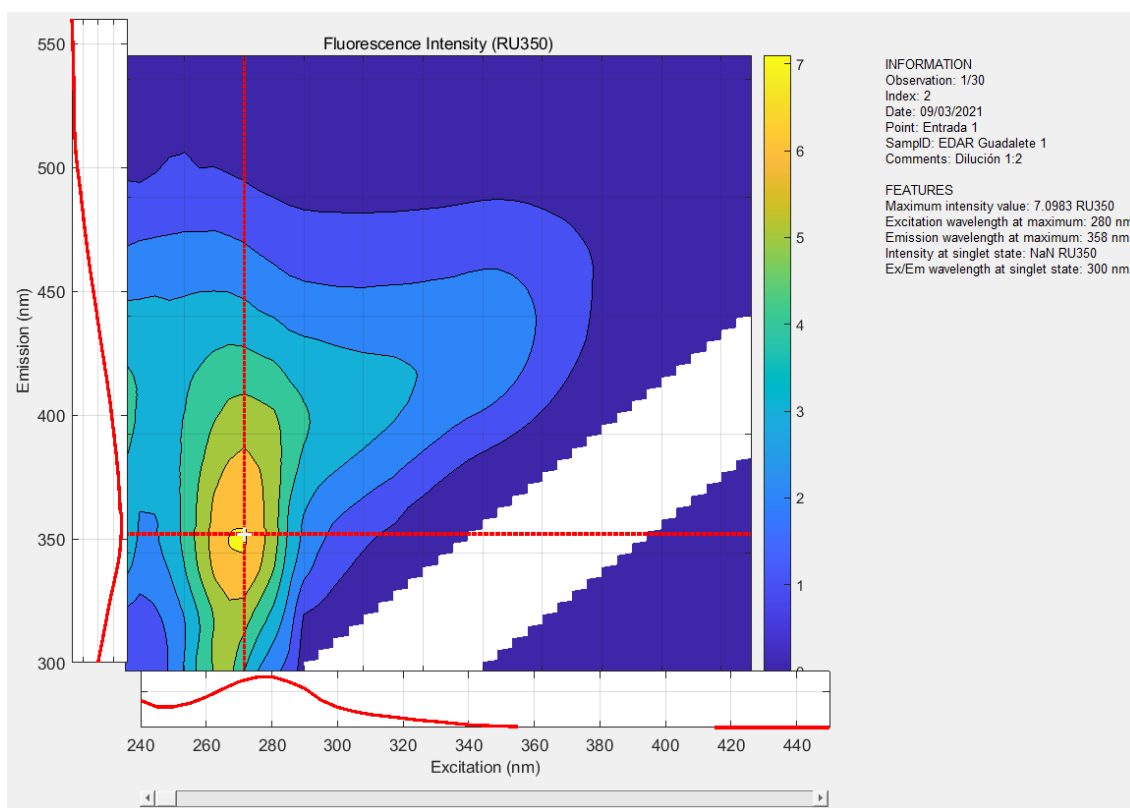


Figura XXIV Gráfico de EEM con las dispersiones correspondientes eliminadas.

c) **Inspeccionar muestras de la base de datos e identificar las muestras válidas:**

1. Plots → Dataset → Collection
2. En la [Figura XXV](#) seleccionar el número de filas (rows) y de columnas (columns) necesarias para visualizar el conjunto de datos.

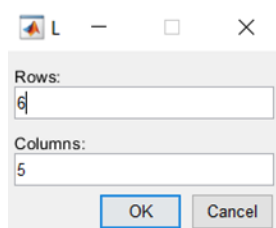


Figura XXV Seleccionar el número de filas y columnas para visualizar el conjunto de datos

2. Se obtienen los siguientes gráficos ([Figura XXVI](#)), no se observan muestras que puedan ser un valor atípico.

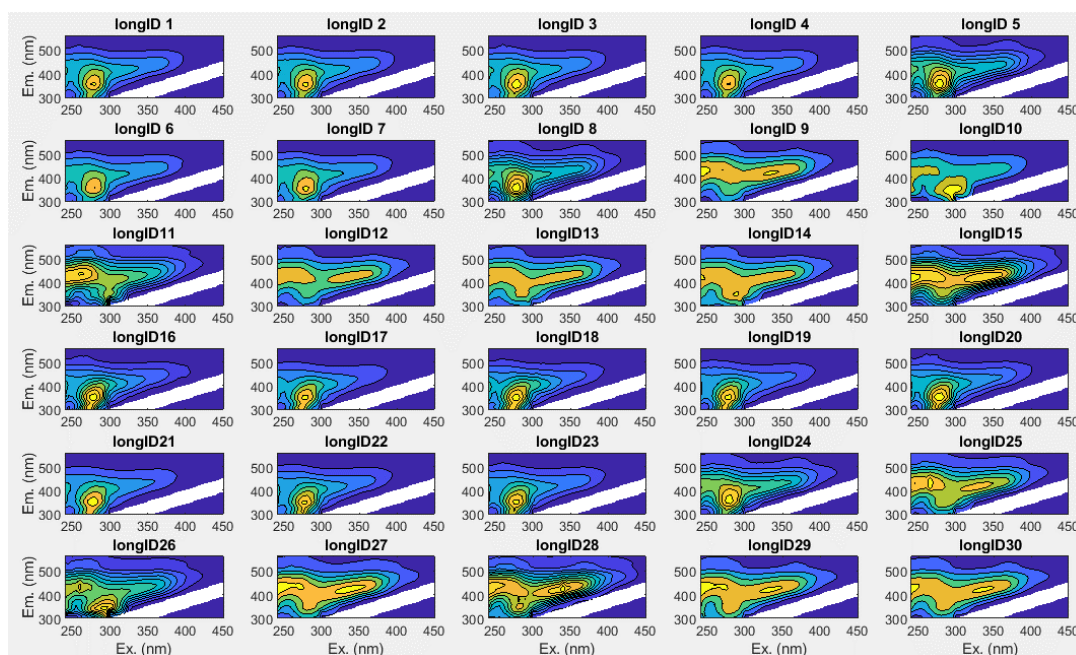


Figura XXVI Visualización del conjunto de datos

d) **Normalización estadística del conjunto de datos:** la normalización del conjunto de datos permite que el modelo se centre en las variaciones químicas entre las muestras.

1. Dataset → Normalize → Forward
2. Se obtiene el siguiente gráfico (Figura XXVII):

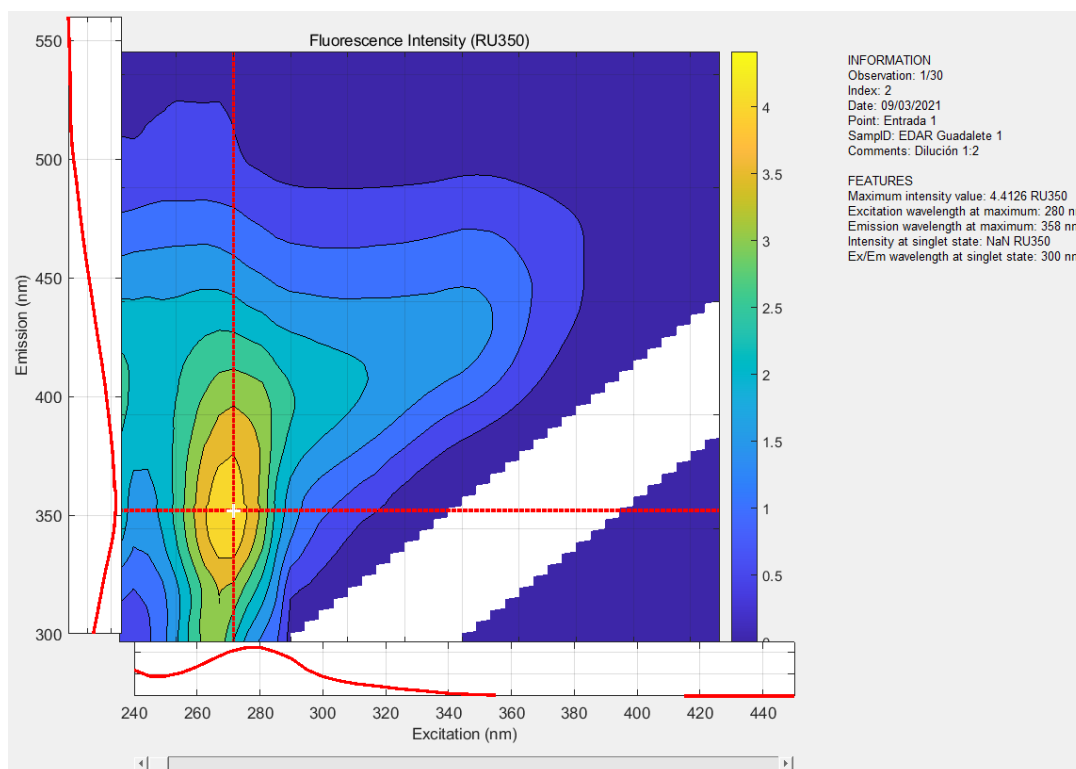


Figura XXVII Gráfico de EEM normalizado

III) Modelado del conjunto de datos

a) Análisis de datos exploratorios:

1. Models → Explore dataset
2. En la [Figura XXVIII](#) en “Number of model components” poner: 3, 4, 5, 6, y pulsar “Run”.
- “Convergence criterion” se deja por defecto en “1e-2”, al igual que “Constraints” en “non-negativity”.

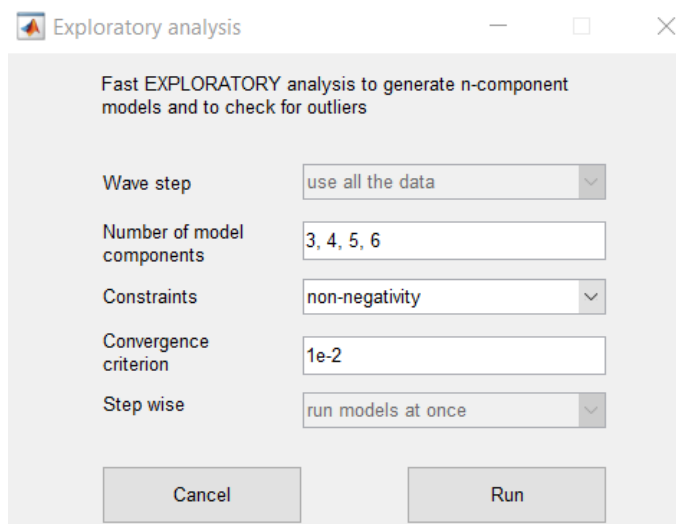


Figura XXIX Análisis exploratorio rápido para generar modelos de n componentes y verificar valores atípicos.

3. Plots → Models → Compare loadings between components
4. Seleccionar en la [Figura XXX](#) todos los modelos y pulsar “OK”

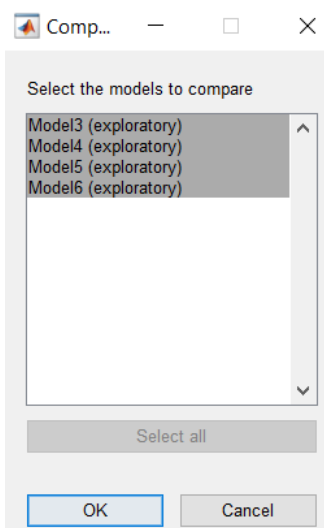


Figura XXX Cuadro de selección de modelos para comparar

5. Se obtienen las siguientes gráficas ([Figura XXXI](#)):

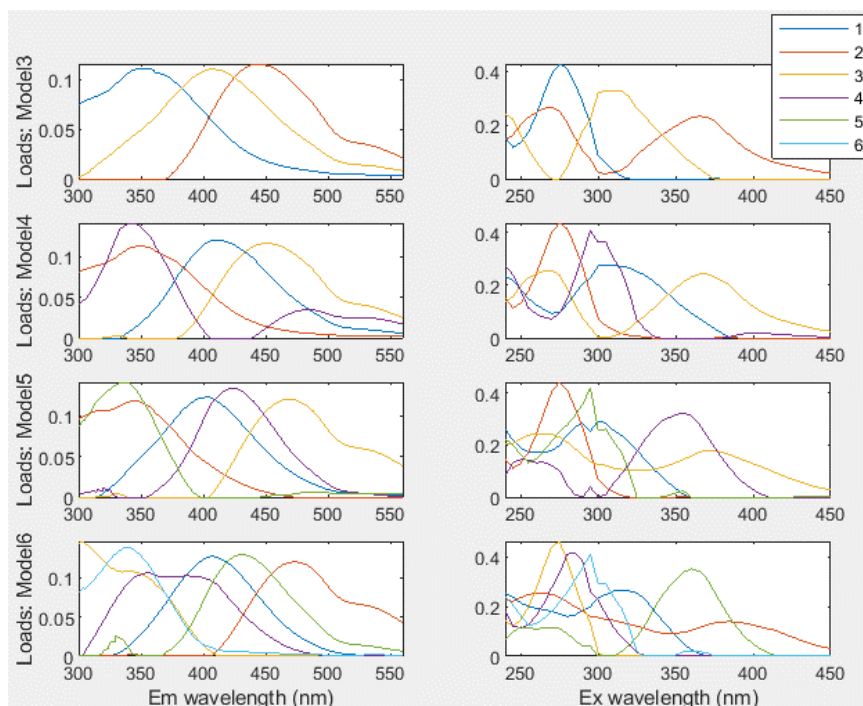


Figura XXXI Comparación de espectros emisión (Em) y excitación (Ex) para modelos con 3 a 6 componentes

b) Diagramas de dispersión:

1. Plots → Models → Correlations between components
2. Seleccionar en la [Figura XXXII](#) el modelo 3 y luego ninguna de las etiquetas:

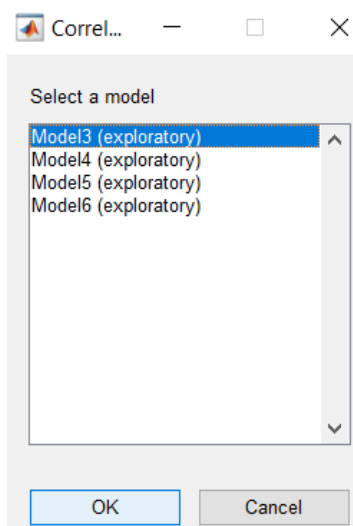


Figura XXXII Cuadro de selección de modelo

3. Hacer lo mismo con los otros modelos y se obtienen los siguientes gráficos (Figuras [XXXIII](#), [XXXIV](#), [XXXV](#) y [XXXVI](#)):

Modelo 3:

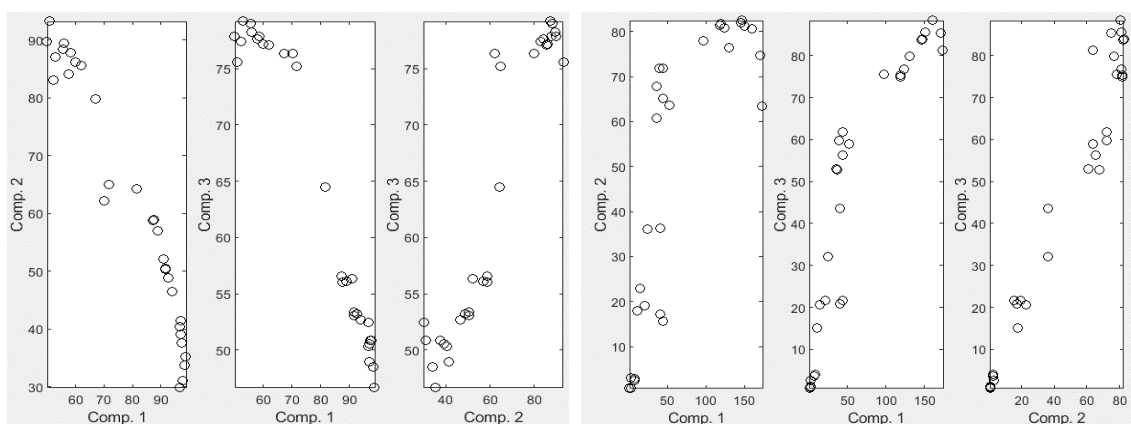


Figura XXXIII Modelo de tres componentes normalizado (izquierda) y sin normalizar (derecha)

Modelo 4:

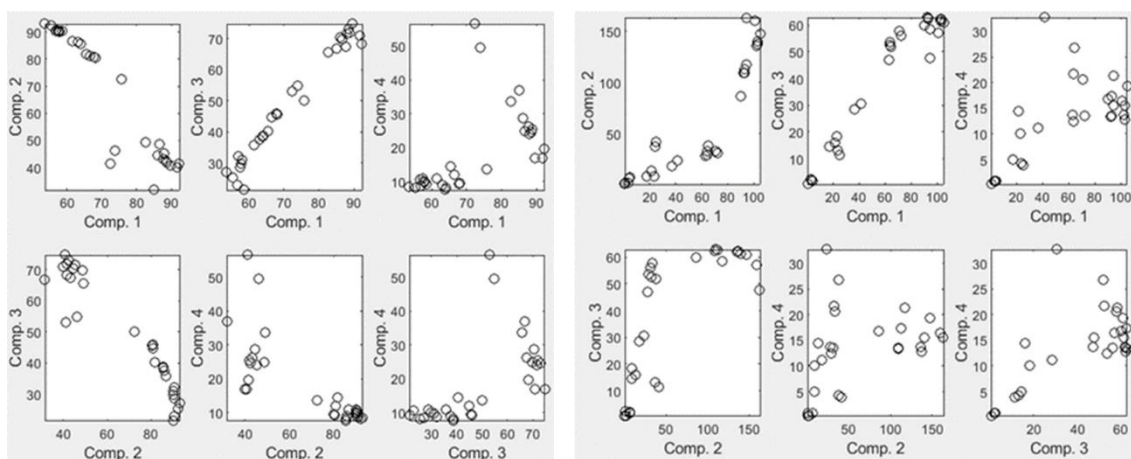


Figura XXXIV Modelo de cuatro componentes normalizado (izquierda) y sin normalizar (derecha)

Modelo 5:

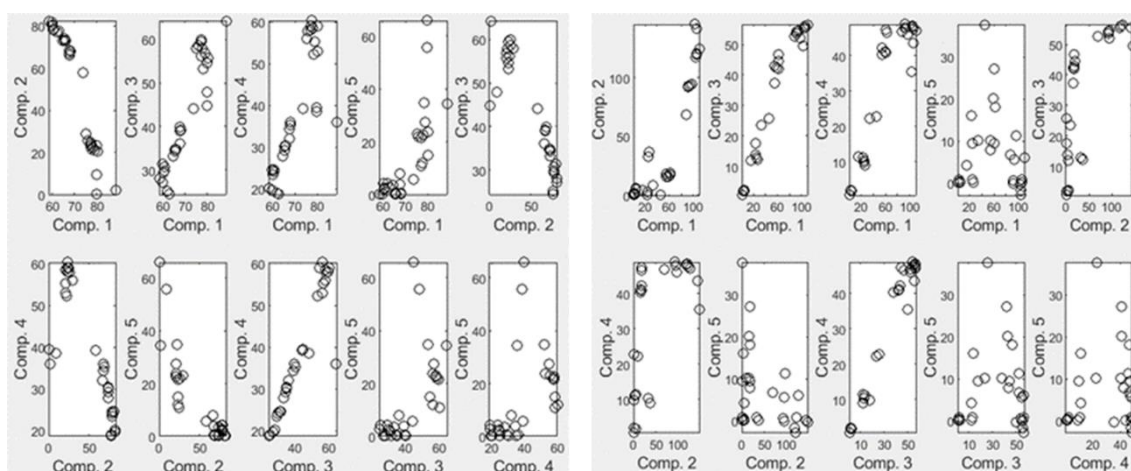


Figura XXXV Modelo de cinco componentes normalizado (izquierda) y sin normalizar (derecha)

Modelo 6:

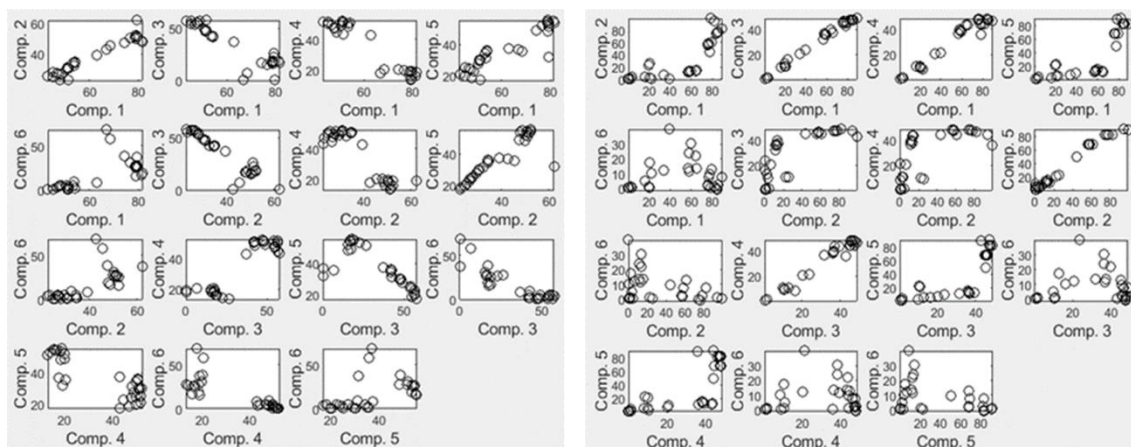


Figura XXXVI Modelo de seis componentes normalizado (izquierda) y sin normalizar (derecha)

Se puede observar cómo se reduce un poco la influencia de las muestras al comparar las gráficas sin normalizar con las normalizadas, aunque esto sería más notorio si se analizaran un mayor número de muestras.

c) Cargas espectrales para los modelos de n componentes:

1. Plots → Models → Spectral loadings per component
2. Seleccionar en la [Figura XXXVII](#) todos los modelos y pulsar “OK”

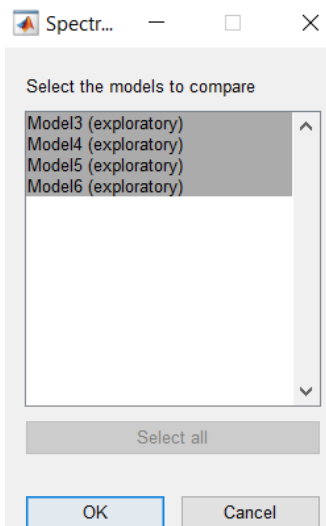


Figura XXXVII Cuadro de selección de modelos

3. Se obtienen las siguientes gráficas ([Figura XXXVIII](#)), la línea discontinua corresponde al espectro de excitación y la línea continua al espectro de emisión.

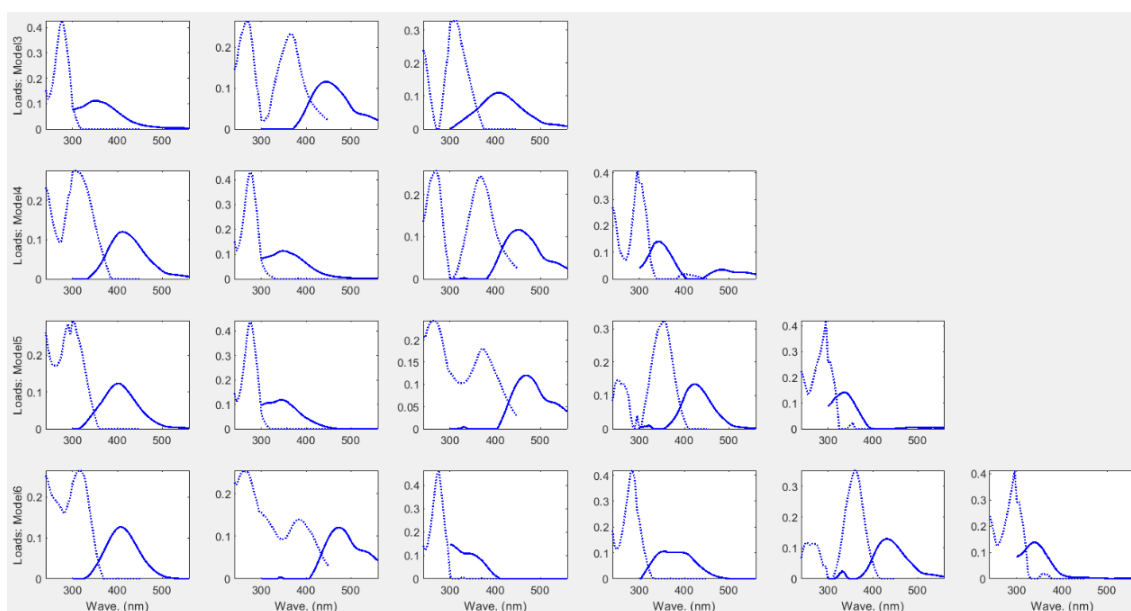


Figura XXXVIII Cargas espectrales para todos los modelos de n-componentes

Este gráfico se utiliza para comprar las formas de onda de las cargas en busca de espectros de excitación o emisión que no correspondan a los fluoróforos, en este caso, se descartaría el modelo de tres componentes.

d) Cargas y apalancamientos para el modelo de componentes:

1. Plots → Models → Loadings & leverages
2. Seleccionar en la [Figura XXXIX](#) el modelo 3 y pulsar “OK”

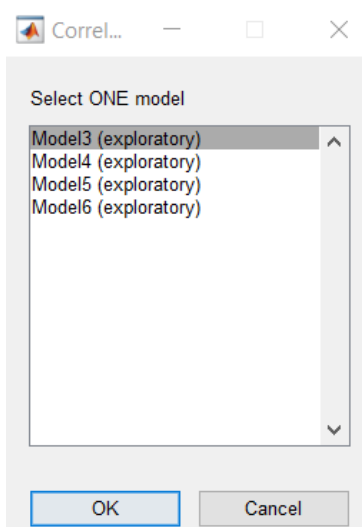


Figura XXXIX Cuadro de selección de modelo

3. Hacer lo mismo con los otros modelos y se obtienen los siguientes gráficos ([Figura XL](#)):

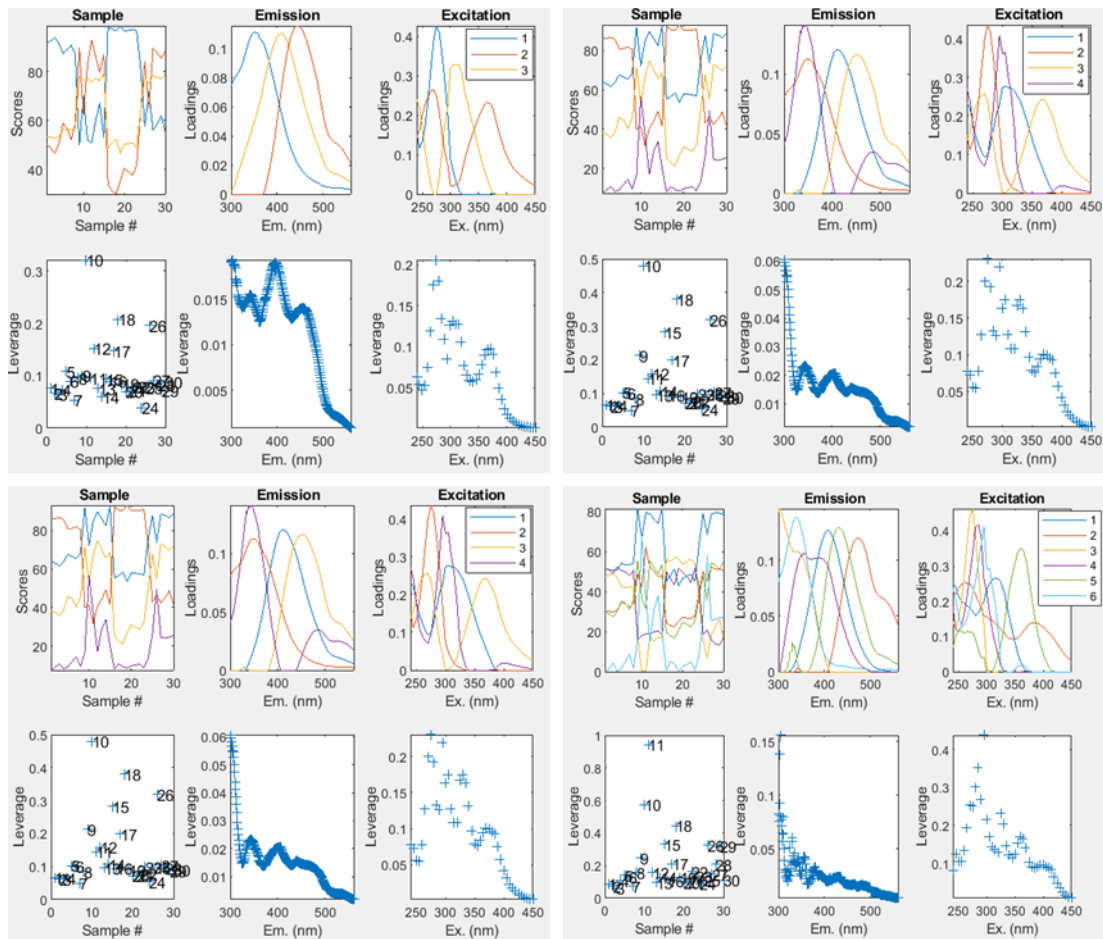


Figura XL Cargas e influencias de los modelos de tres componentes (izquierda arriba), cuatro componentes (derecha arriba), cinco componentes (izquierda abajo) y seis componentes (derecha abajo).

La influencia (leverage) es un número entre cero y uno que expresa una desviación de la distribución de datos promedio, las muestras que no son muy diferentes a otras tienen apalancamiento cercano a cero, mientras que las muestras muy atípicas tienen apalancamiento cercano a uno. En este caso, no tomaríamos ninguna muestra como valor atípico ya que hay muy pocas observaciones.

e) Error residual:

1. Plots → Models → Error residuals for one model
2. Seleccionar en la [Figura XLI](#) el modelo 3 y pulsar “OK”.

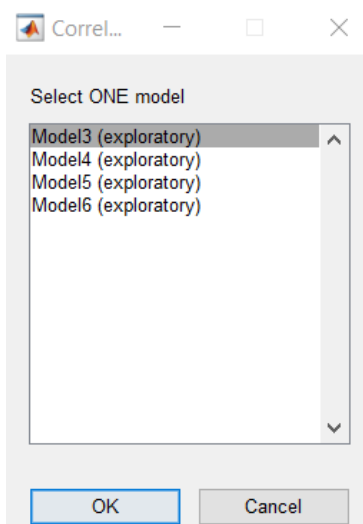


Figura XLI Cuadro de selección de modelo

3. Hacer lo mismo con los otros modelos y se obtienen los siguientes gráficos (Figuras [XLII](#), [XLIII](#), [XLIV](#) y [XLV](#)):

Modelo 3:

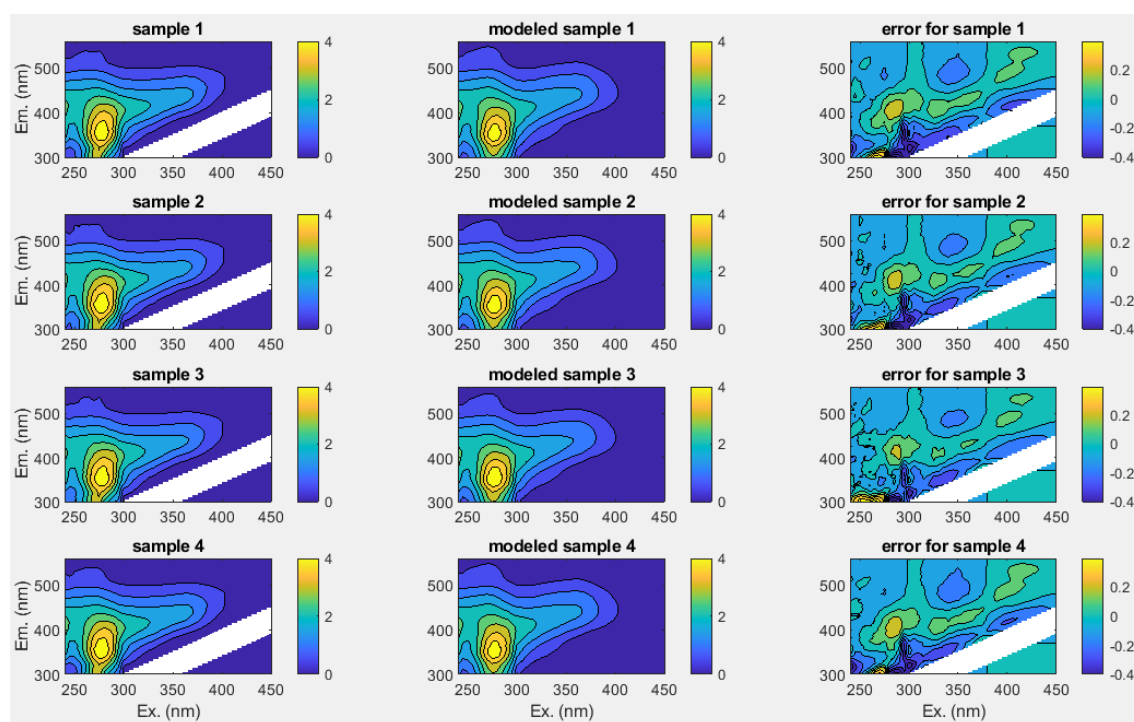


Figura XLII Error residual del modelo de tres componentes

Modelo 4:

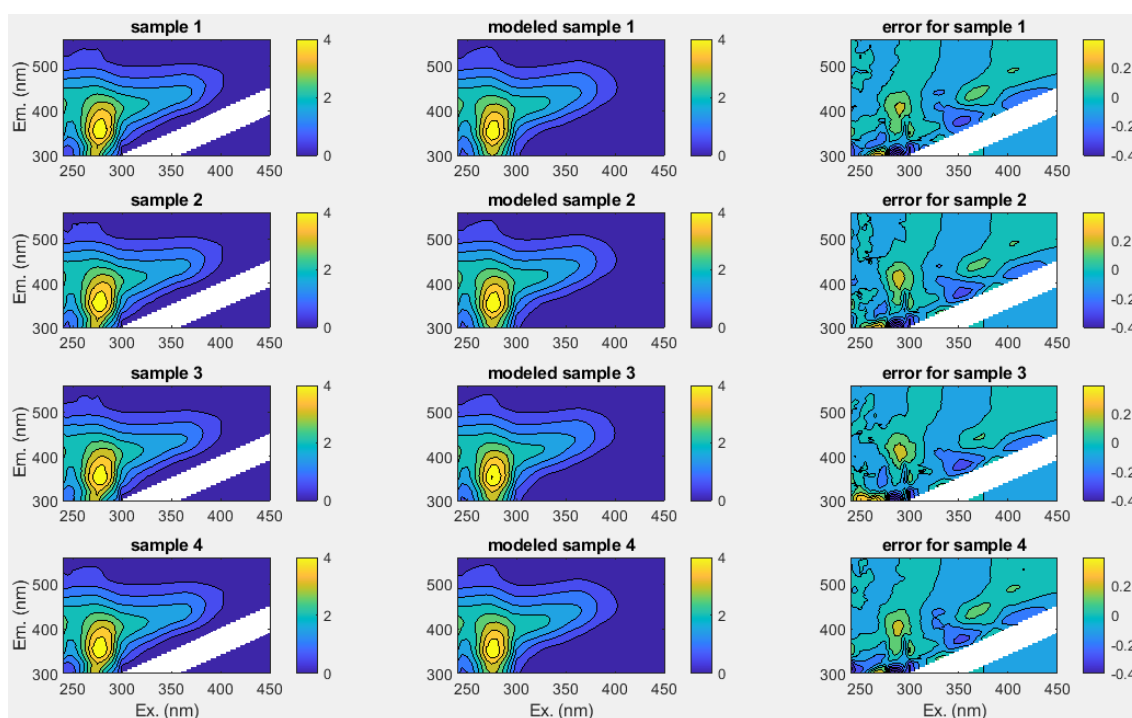


Figura XLIII Error residual del modelo de cuatro componentes

Modelo 5:

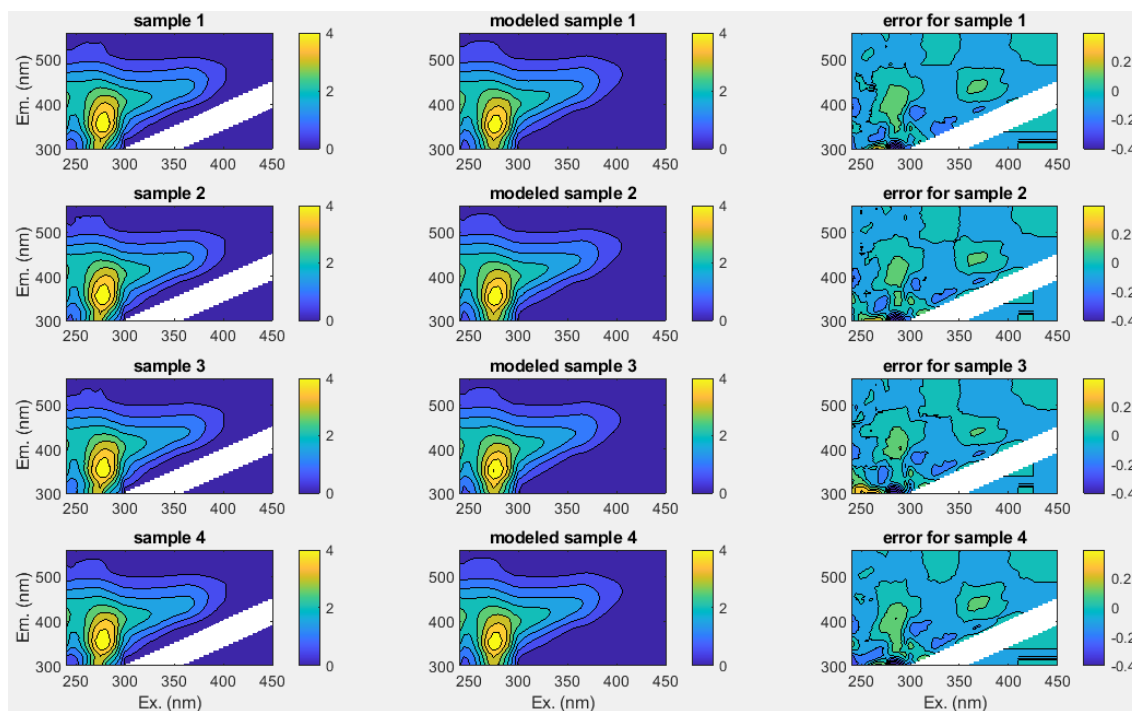


Figura XLIV Error residual del modelo de cinco componentes

Modelo 6:

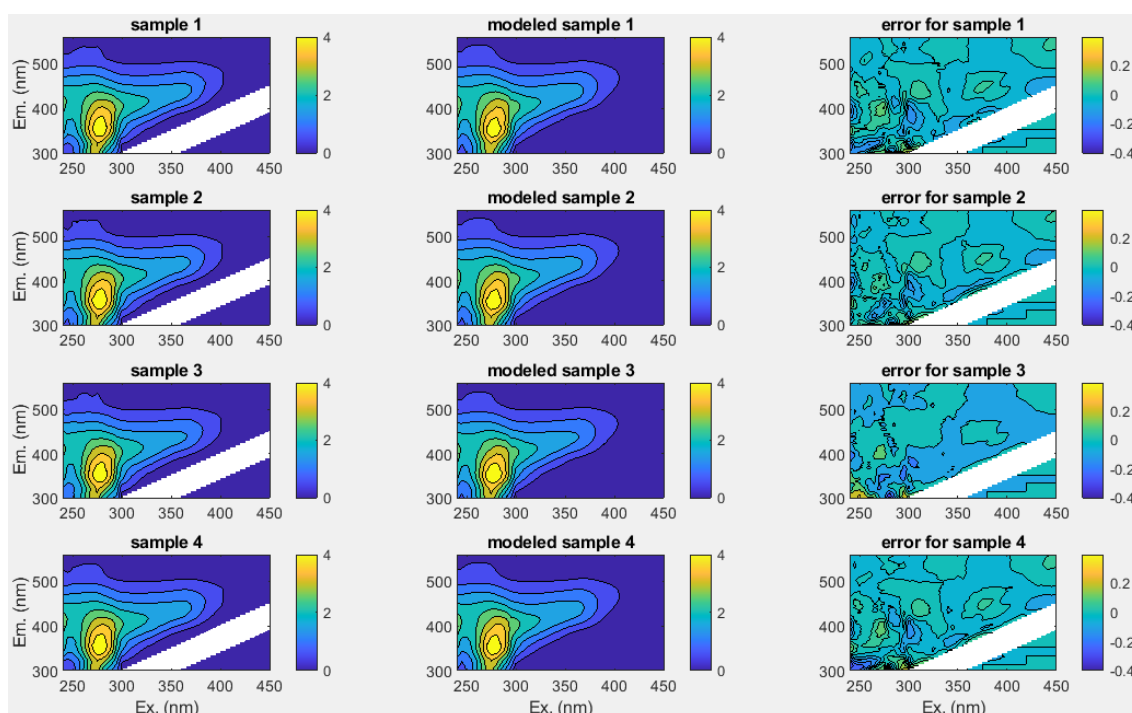


Figura XLV Error residual del modelo de seis componentes

Revisando los gráficos para todas las muestras de los cuatro modelos, observamos que los modelos de cinco y seis componentes son los que tienen un menor error, mientras que el modelo con mayor error es el modelo de tres componentes.

f) Comparar errores residuales entre dos modelos:

1. Plots → Models → Compare error residuals (two models)
2. Seleccionar en la [Figura XLVI](#) los modelos 4 y 5, y pulsar “OK”.

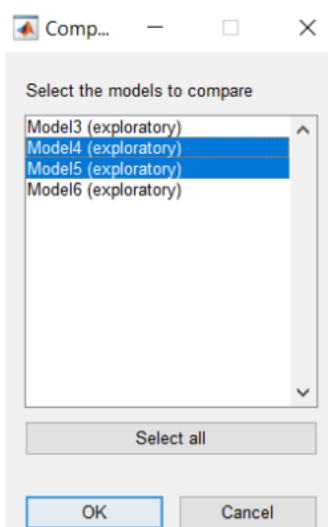


Figura XLVI Cuadro de selección de modelos

3. Se obtienen las siguientes gráficas ([Figura XLVII](#)):

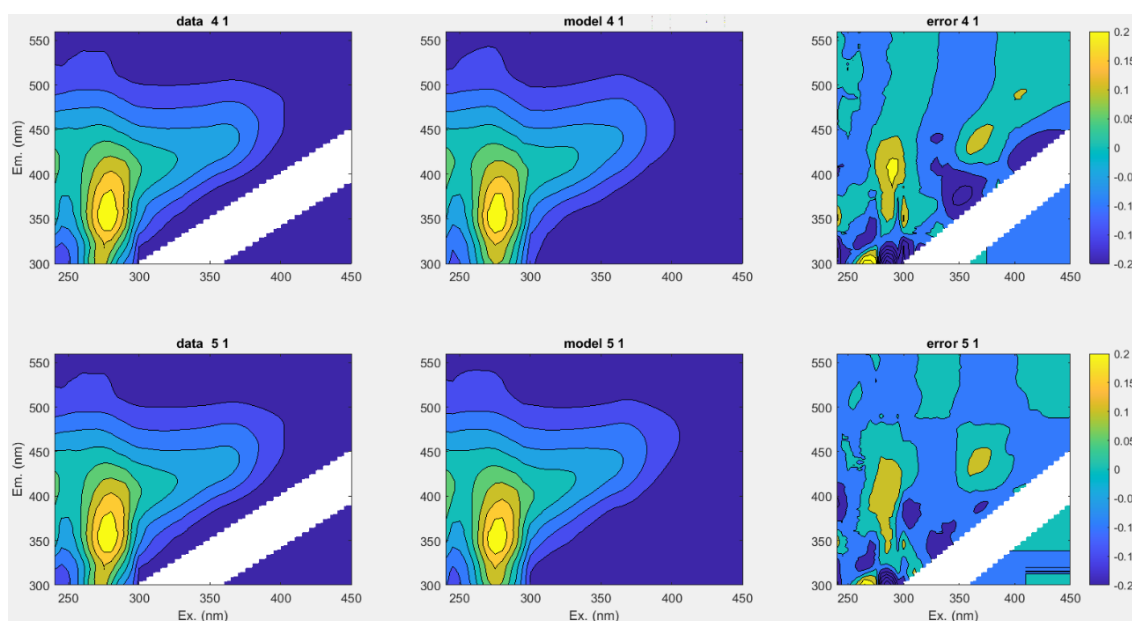


Figura XLVII39 Error residual de los modelos de cuatro (fila de arriba) y cinco (fila de abajo) componentes.

4. Comparar ahora el modelo 4 con el modelo 6 y se obtienen las siguientes gráficas

(Figura XLVIII):

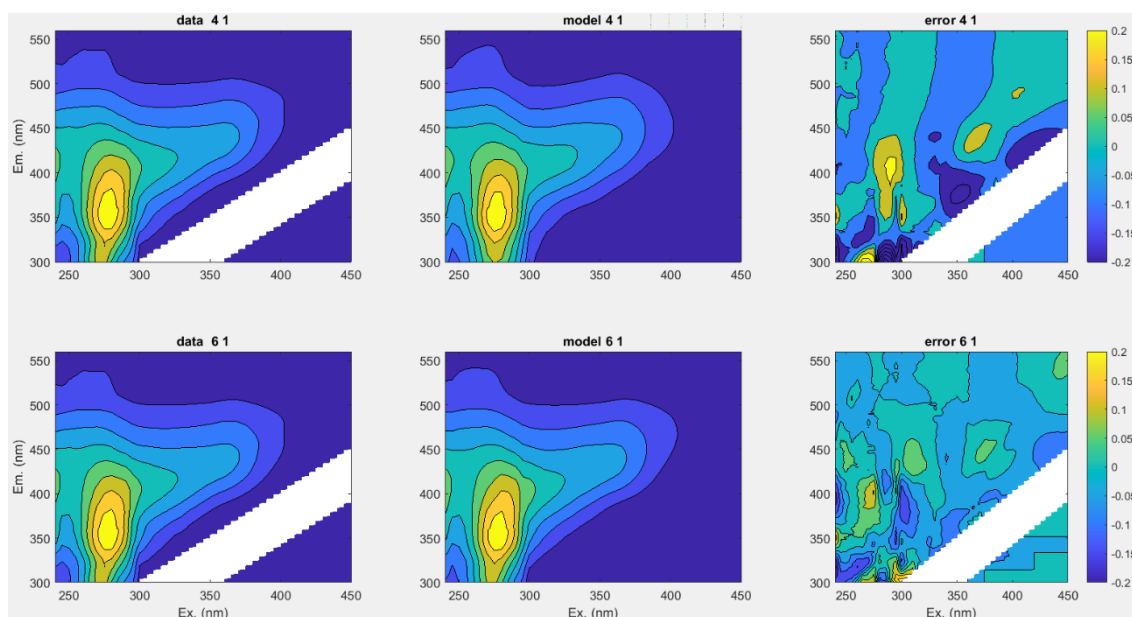


Figura XLVIII40 Error residual de los modelos de cuatro (fila de arriba) y seis (fila de abajo) componentes.

5. Comparar ahora el modelo 5 con el modelo 6 y se obtienen las siguientes gráficas

(Figura XLIX):

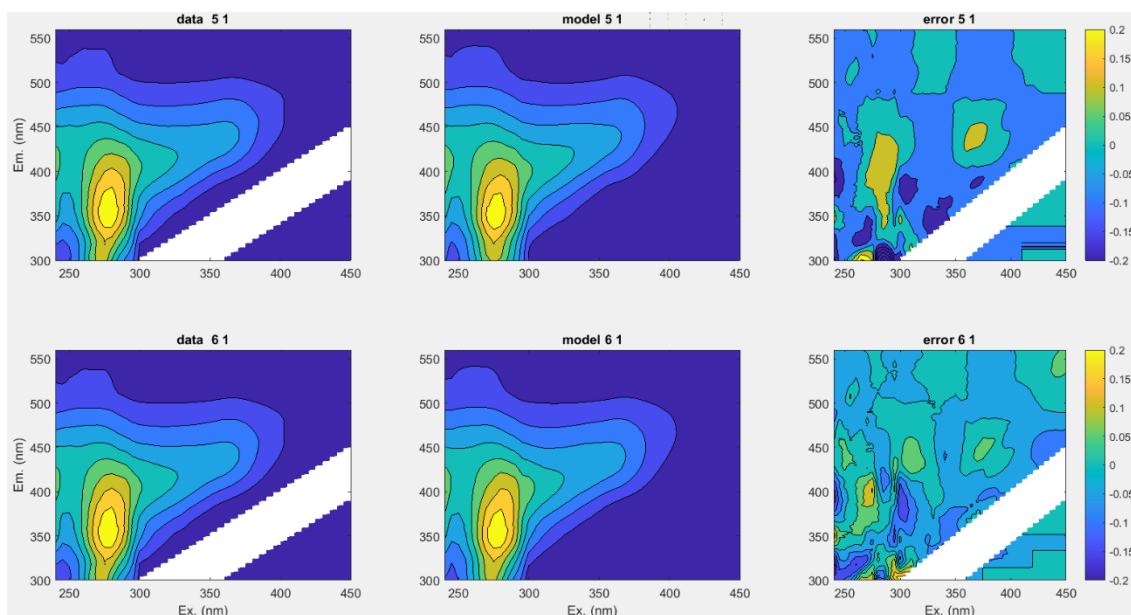


Figura XLIX Error residual de los modelos de cinco (fila de arriba) y seis (fila de abajo) componentes.

Con estas comparaciones concluimos que el modelo de cinco componentes tiene menor error que el modelo de cuatro componentes, y que el modelo de seis componentes es el que tiene menor error de los tres modelos comparados.

g) Comparar la suma del error al cuadrado:

1. Plots → Models → Spectral Sum of Squared Error (SSE)
2. Seleccionar en la [Figura L](#) todos los modelos.

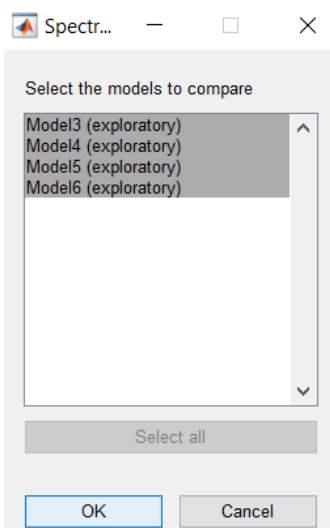


Figura L Cuadro de selección de modelos

3. Se obtienen las siguientes gráficas ([Figura LI](#)):

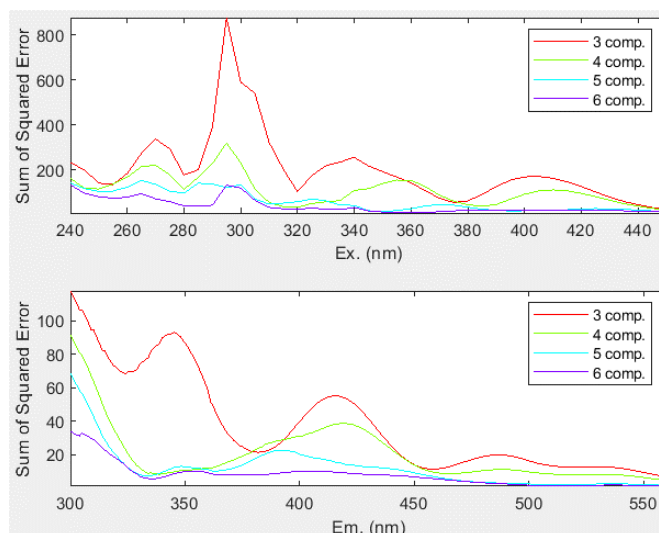


Figura LI SSE para los espectros de todos los modelos

Se observa que tanto para el espectro de excitación como para el espectro de emisión el error es mayor en el modelo de tres componentes, siendo los modelos de cinco y seis componentes los de menor error.

h) Refinamiento del modelo:

1. Models → Refine model

2. En la [Figura LII](#) seleccionar en “Model to refine” el modelo 3, y pulsar “Run”, lo hacemos con todos los modelos. “Convergence criterion” se deja por defecto en “1e-6”, al igual que “Constraints” en “non-negativity”, y “Times to run” en “10”. El modelo de mínimos cuadrados se elige entre todas las ejecuciones del modelo.

Figura LII Cuadro para realizar el refinamiento de modelos PARAFAC por inicialización aleatoria.

3. Se obtienen las siguientes gráficas ([Figura LIII](#)):

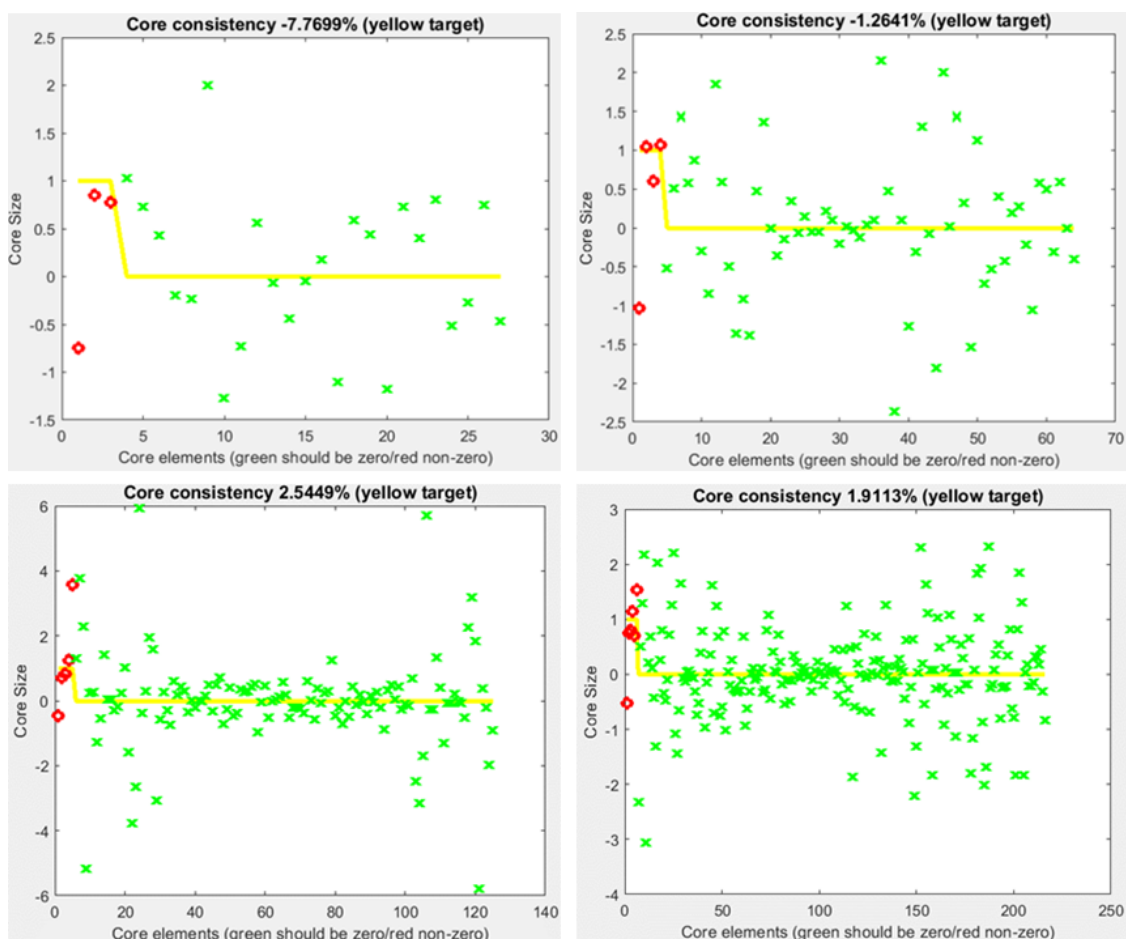


Figura LIII Consistencia del núcleo de los modelos de tres componentes (izquierda arriba), cuatro componentes (derecha arriba), cinco componentes (izquierda abajo) y seis componentes (derecha abajo).

Los modelos especificados con un número apropiado de componentes deben tener una alta consistencia de núcleo (cerca del 100%), mientras que las consistencias de núcleo bajas indican que se especificaron demasiados componentes. Con los porcentajes obtenidos en las gráficas concluimos que los modelos 5 y 6 serían los más válidos en comparación con los modelos 3 y 4, siendo el modelo 5 el más válido.

Sin embargo, se debe tener en cuenta que, en la práctica, para conjuntos de datos no ideales (datos reales), la consistencia del núcleo no siempre es un diagnóstico confiable de la cantidad de componentes PARAFAC necesarios.

i) Gráficos de huellas dactilares:

1. Plots → Models → Fingerprints
2. Seleccionar cada uno de los modelos y pulsar “OK”
3. Se obtienen las siguientes gráficas (Figuras [LIV](#), [LV](#), [LVI](#) y [LVII](#)):

Modelo 3:

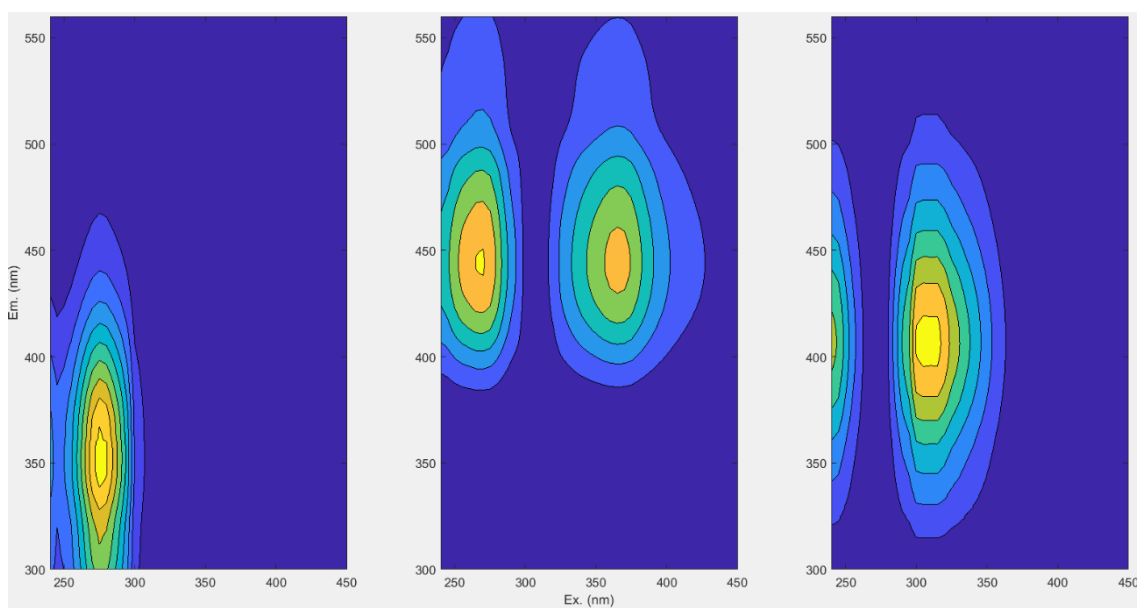


Figura LIV Gráfico de “huellas dactilares” del modelo PARAFAC refinado de tres componentes.

Modelo 4:

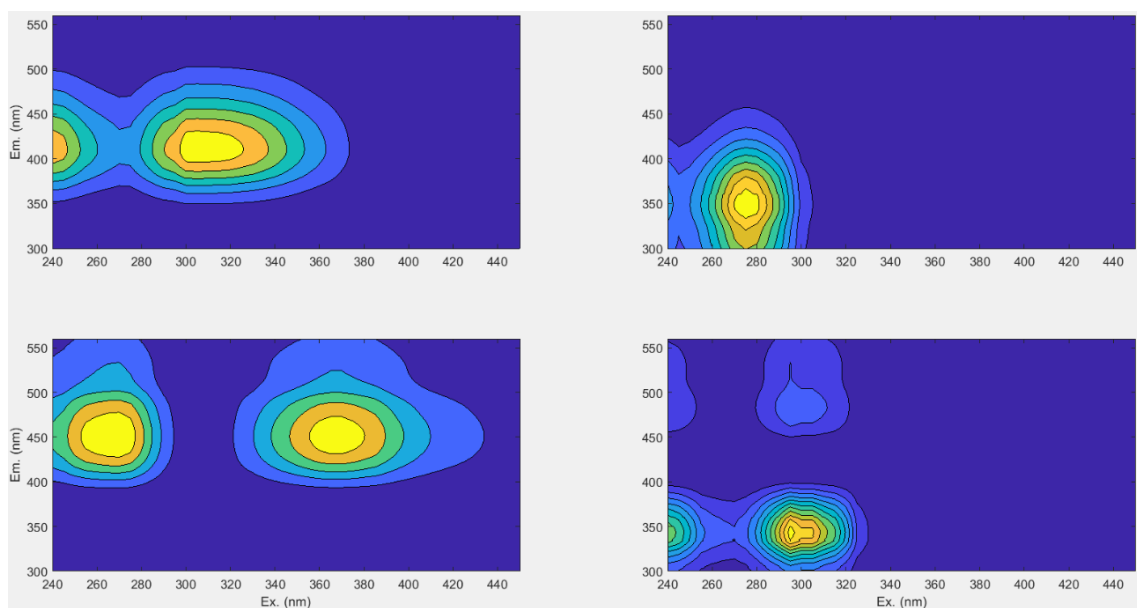


Figura LV4I Gráfico de “huellas dactilares” del modelo PARAFAC refinado de cuatro componentes.

Modelo 5:

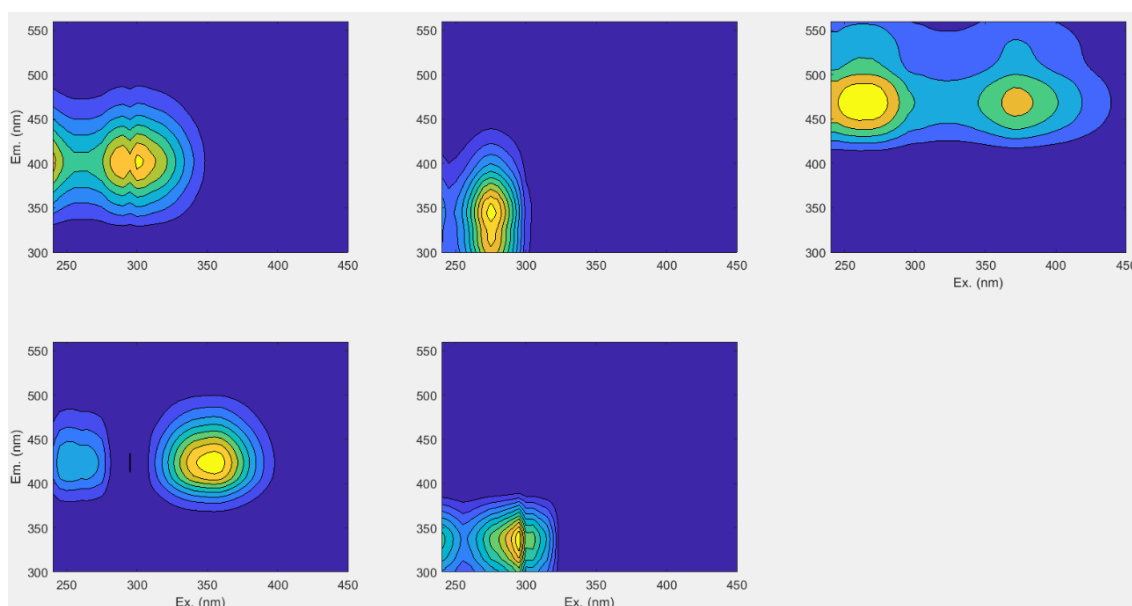


Figura LVI Gráfico de “huellas dactilares” del modelo PARAFAC refinado de cinco componentes.

Modelo 6:

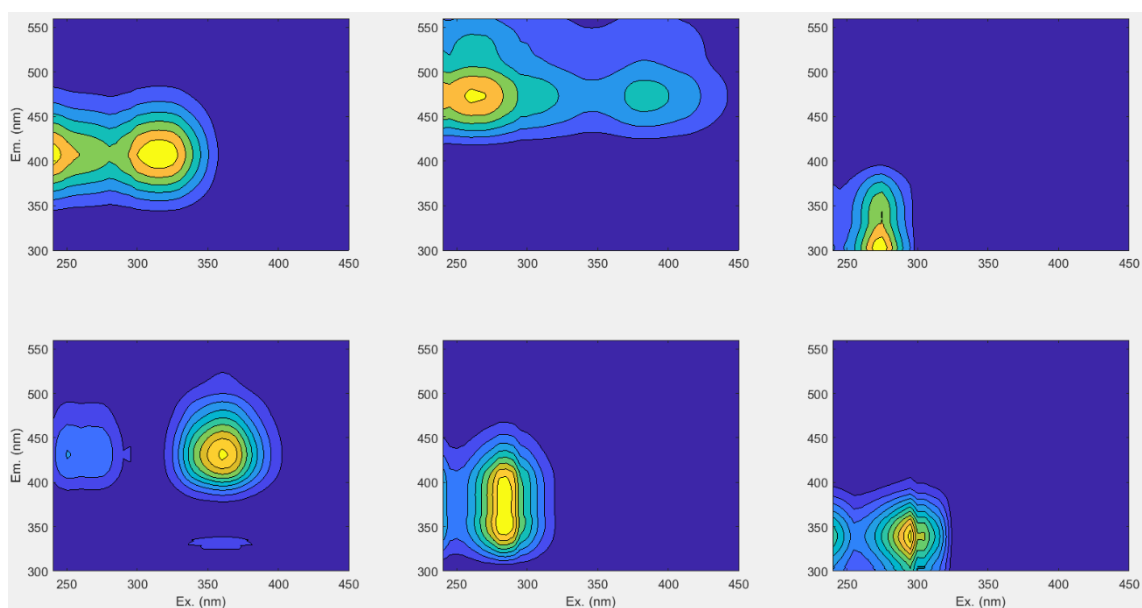


Figura LVII Gráfico de “huellas dactilares” del modelo PARAFAC refinado de seis componentes.

j) Mapa de componentes:

1. Plots → Models → Map components
2. Seleccionar cada uno de los modelos y pulsar “OK”
3. Se obtienen las siguientes gráficas (Figura LVIII):

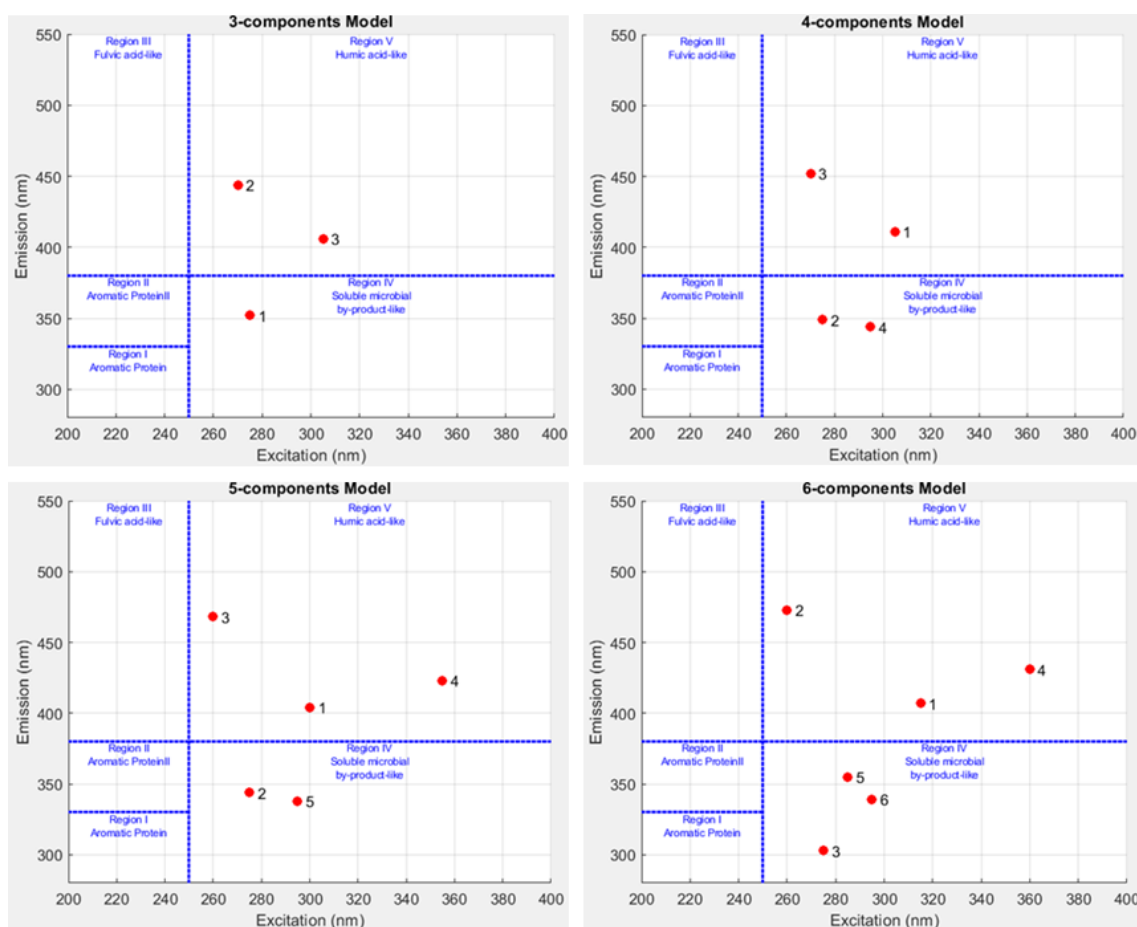


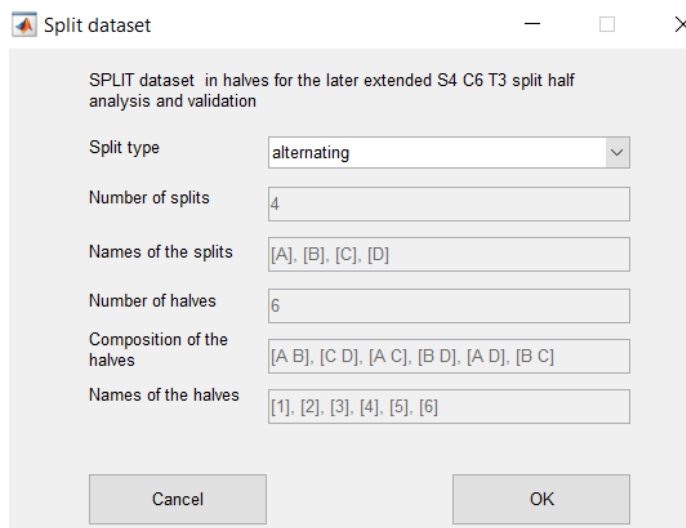
Figura LVIII Mapa de componentes del modelo PARAFAC refinado de tres componentes (izquierda arriba), cuatro componentes (derecha arriba), cinco componentes (izquierda abajo) y seis componentes (derecha abajo).

El mapa de componentes nos indica aproximadamente la región en la que se encuentra cada uno de los componentes de cada modelo.

k) Análisis de la mitad dividida

1. Dividir el conjunto de datos en 4 partes, combinar estas partes en 6 mitades y, finalmente, recombinar las mitades en 3 nuevos conjuntos de datos de prueba (S₄C₆T₃):
Models → Split half analysis → Split the dataset

2. En la [Figura LIX](#) “Split type” se deja por defecto en “alternating”.



Split dataset

SPLIT dataset in halves for the later extended S4 C6 T3 split half analysis and validation

Split type:

Number of splits:

Names of the splits:

Number of halves:

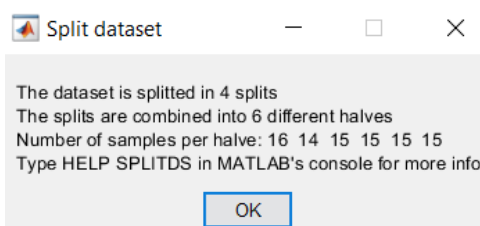
Composition of the halves:

Names of the halves:

Figura LIX Cuadro para dividir el conjunto de datos (Split dataset)

Divide el conjunto de datos en mitades para el posterior análisis y validación de la mitad dividida S4 C6 T3.

3. Sale la siguiente información en la [Figura LX](#), pulsar “OK”.



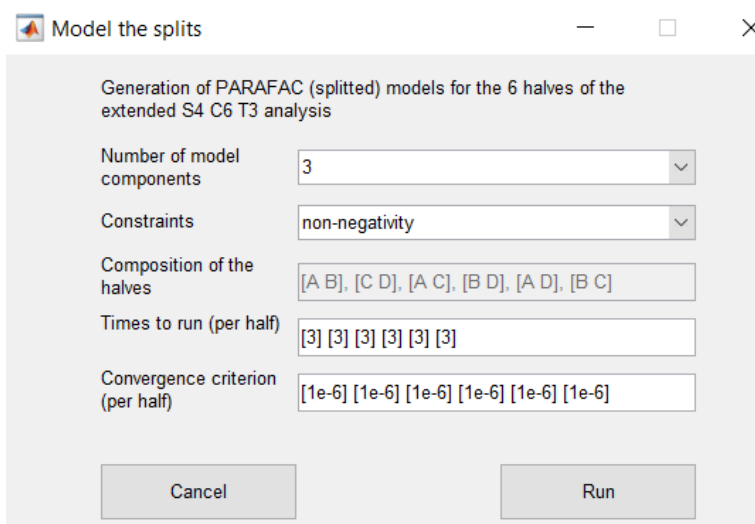
Split dataset

The dataset is splitted in 4 splits
The splits are combined into 6 different halves
Number of samples per half: 16 14 15 15 15 15
Type HELP SPLITDS in MATLAB's console for more info

Figura LX Cuadro de información con el conjunto de datos divididos

4. Calcular el modelo dividido de todos los modelos: Models → Split half analysis → Model the splits.

5. En la [Figura LXI](#) “Constraints” se deja por defecto en “non-negativity”.



Model the splits

Generation of PARAFAC (splitted) models for the 6 halves of the extended S4 C6 T3 analysis

Number of model components:

Constraints:

Composition of the halves:

Times to run (per half):

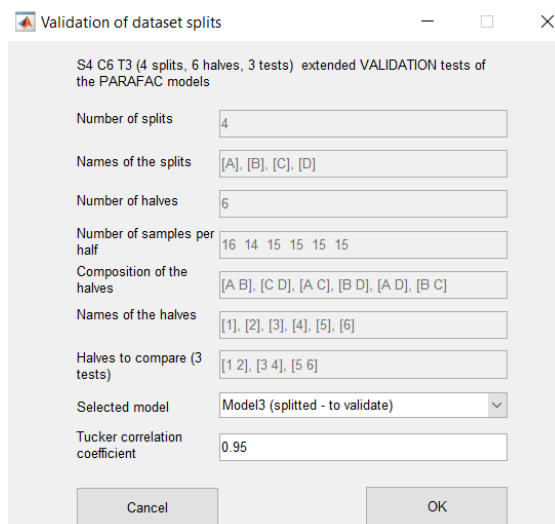
Convergence criterion (per half):

Figura LXI Cuadro para modelar las divisiones (Model the splits)

Genera modelos PARAFAC divididos para las 6 mitades del análisis extendido S4 C6 T3.

I) Validaciones:

1. Models → Validations → Validate the splits
2. En la [Figura LXII](#) se van seleccionando cada modelo y en “Tucker correlation coefficient” primero se ha realizado con 0.95 y luego con 0.91.



Validation of dataset splits

S4 C6 T3 (4 splits, 6 halves, 3 tests) extended VALIDATION tests of the PARAFAC models

Number of splits: 4

Names of the splits: [A], [B], [C], [D]

Number of halves: 6

Number of samples per half: 16 14 15 15 15 15

Composition of the halves: [A B], [C D], [A C], [B D], [A D], [B C]

Names of the halves: [1], [2], [3], [4], [5], [6]

Halves to compare (3 tests): [1 2], [3 4], [5 6]

Selected model: Model3 (splitted - to validate)

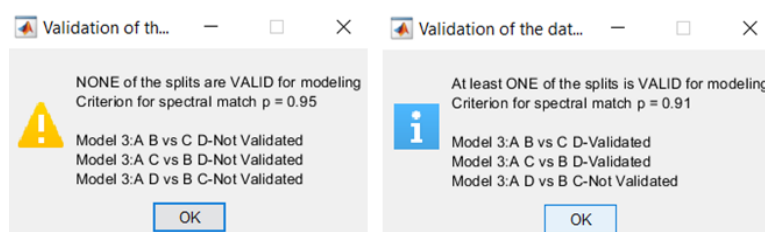
Tucker correlation coefficient: 0.95

Buttons: Cancel, OK

Figura LXII Cuadro para la validación de las divisiones del conjunto de datos

2. Se obtienen las siguientes gráficas:

Modelo 3:



Validation of th... Validation of the dat...

NONE of the splits are VALID for modeling
Criterion for spectral match $p = 0.95$

Model 3: A B vs C D-Not Validated
Model 3: A C vs B D-Not Validated
Model 3: A D vs B C-Not Validated

At least ONE of the splits is VALID for modeling
Criterion for spectral match $p = 0.91$

Model 3: A B vs C D-Validated
Model 3: A C vs B D-Validated
Model 3: A D vs B C-Not Validated

Buttons: OK, OK

Figura LXIII Validación del conjunto de datos para el modelo de tres componentes

En la [Figura LXIII](#) se observa como no es válido para $p = 0.95$, pero si para $p = 0.91$

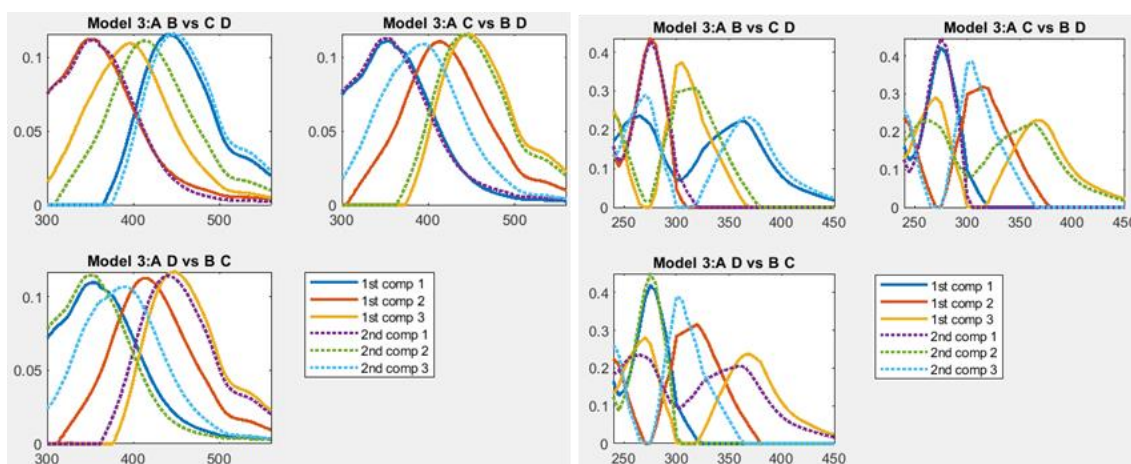


Figura LXIV42 Figuras obtenidas al validar el modelo de tres componentes

La [Figura LXIV](#) muestra las gráficas obtenidas al validar el modelo de tres componentes, en este caso sólo serían válidas las comparaciones “A B vs C D” y “A C vs B D”.

Modelo 4:

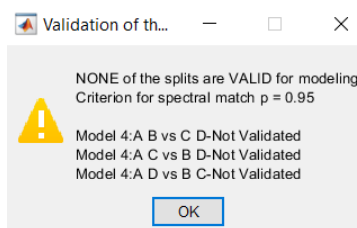


Figura LXV Validación del conjunto de datos para el modelo de cuatro componentes

En la [Figura LXV](#) se observa que no se valida para $p = 0.95$, aunque tampoco para $p = 0.91$.

Modelo 5:

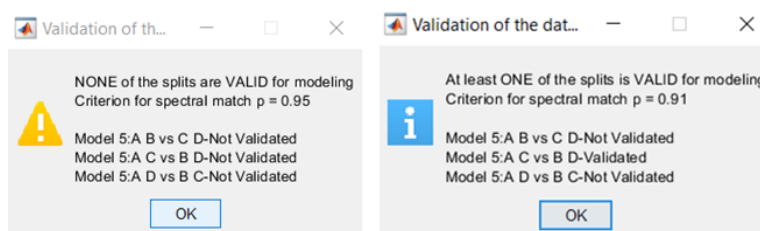


Figura LXVI Validación del conjunto de datos para el modelo de cinco componentes

En la [Figura LXVI](#) se observa como no es válido para $p = 0.95$, pero si para $p = 0.91$

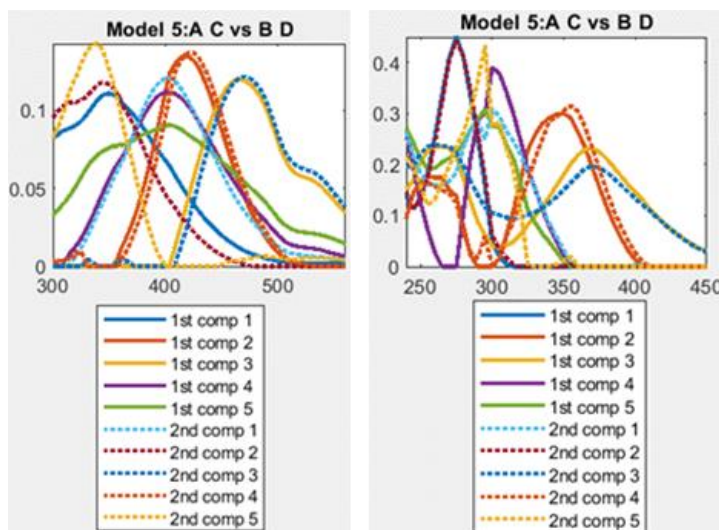


Figura LXVII Figuras obtenidas al validar el modelo de cinco componentes

La Figura LXVII muestra las gráficas obtenidas al validar el modelo de cinco componentes, en este caso sólo sería válida la comparación “A C vs B D”.

Modelo 6:

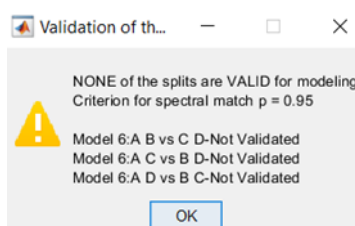


Figura LXVIII Validación del conjunto de datos para el modelo de seis componentes

En la Figura LXVIII se observa que no se valida para $p = 0.95$, aunque tampoco para $p = 0.91$.

3. Para los modelos 3 y 5: Models → Validations → Validate the model

4. Se obtienen las siguientes gráficas:

Modelo 3:

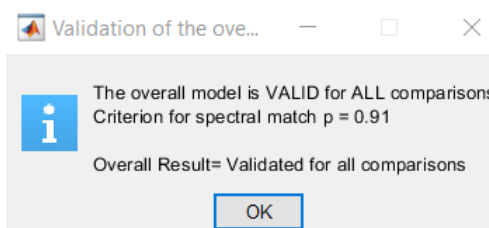


Figura LXIX Validación de todas las comparaciones del modelo de tres componentes

En la Figura LXIX se observa que se validan todas las comparaciones para $p = 0.91$.

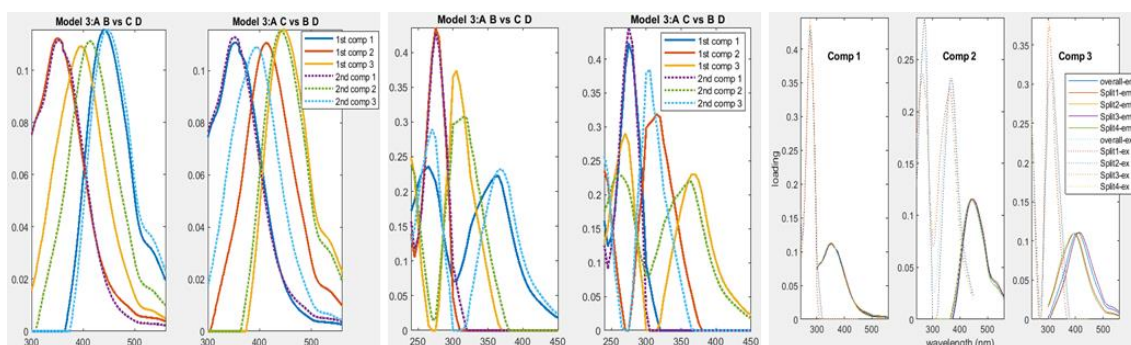


Figura LXX Figuras obtenidas al validar todas las comparaciones del modelo de tres componentes.

La [Figura LXX](#) muestra las gráficas obtenidas al validar todas las comparaciones para el modelo de tres componentes.

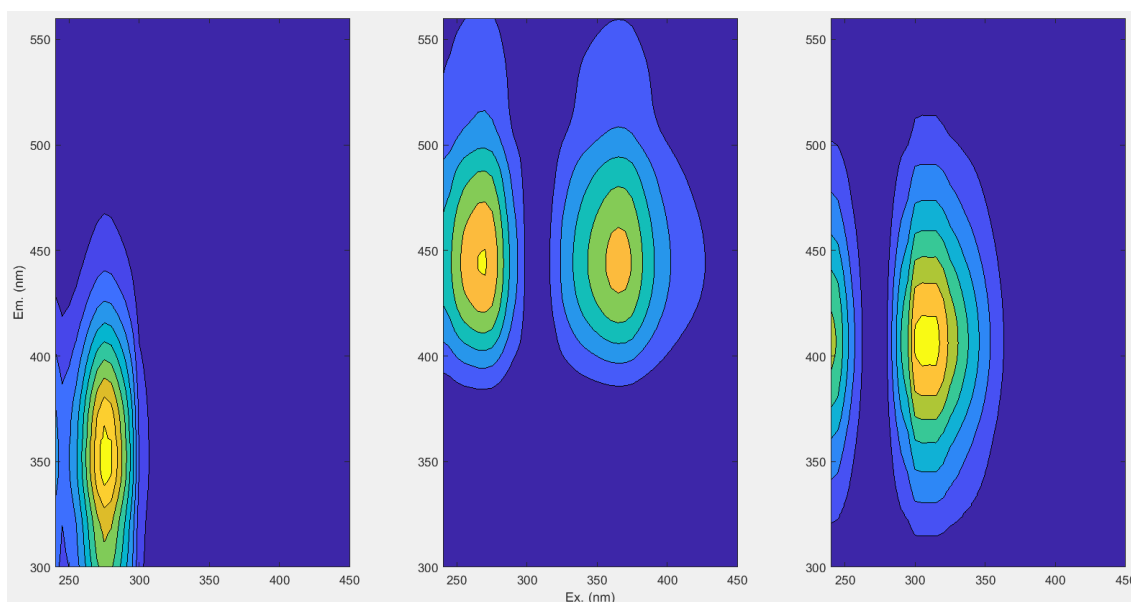


Figura LXXI Gráfico de “huellas dactilares” del modelo de tres componentes validado.

La [Figura LXXI](#) muestra la gráfica de “huellas dactilares” obtenida al validar todas las comparaciones para el modelo de tres componentes.

Modelo 5:

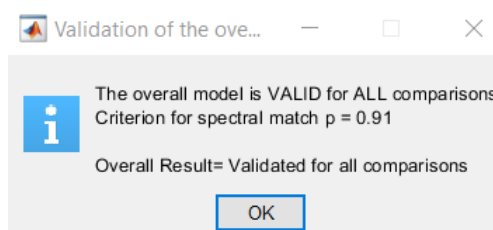


Figura LXXII Validación de todas las comparaciones del modelo de cinco componentes.

En la [Figura LXXII](#) se observa que se validan todas las comparaciones para $p = 0.91$.

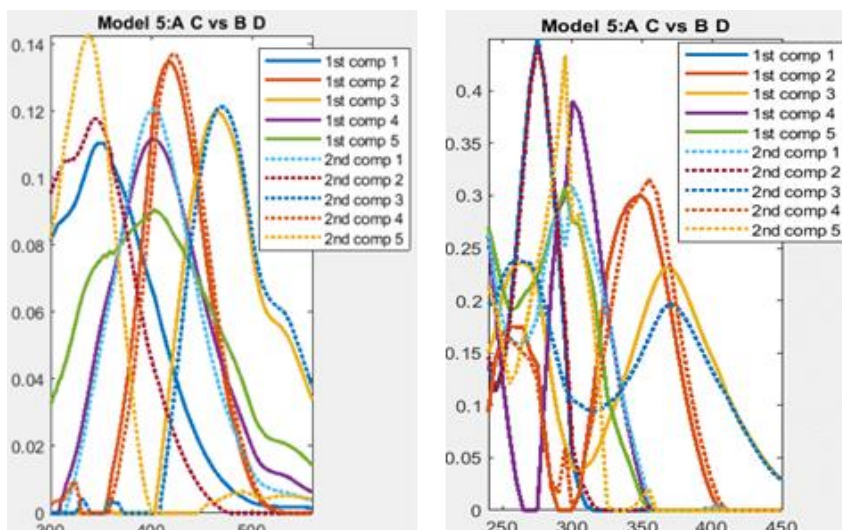


Figura LXXIII Figuras obtenidas al validar todas las comparaciones del modelo de cinco componentes.

La Figura LXXIII muestra las gráficas obtenidas al validar todas las comparaciones para el modelo de cinco componentes.

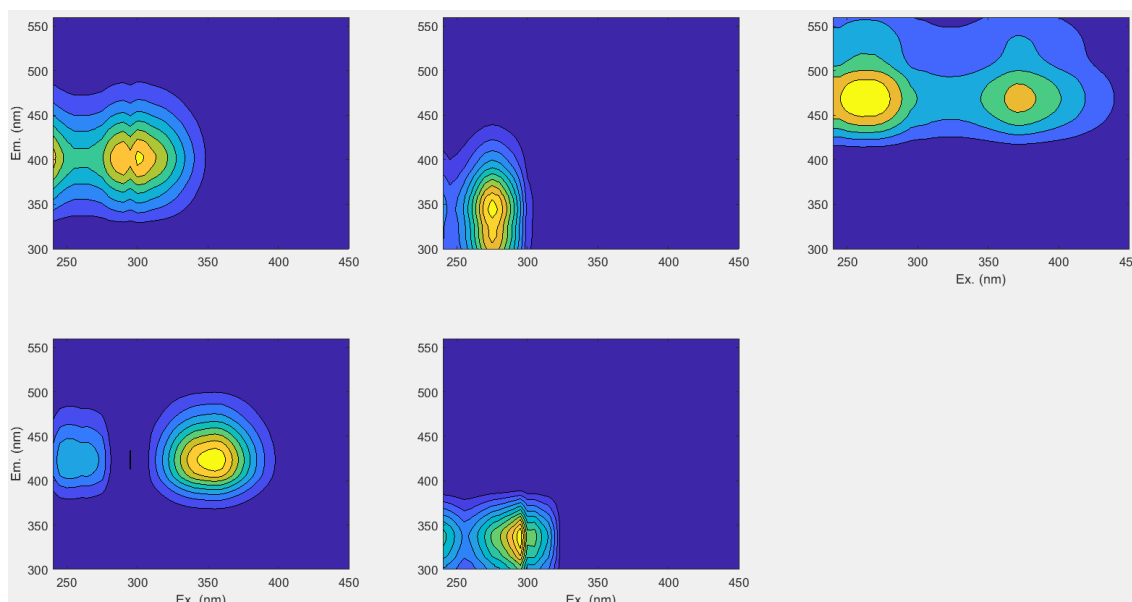


Figura LXXIV Gráfico de “huellas dactilares” del modelo de cinco componentes validado.

La Figura LXXIV muestra la gráfica de “huellas dactilares” obtenida al validar todas las comparaciones para el modelo de cinco componentes.

IV) Conclusiones:

Teniendo en cuenta lo visualizado y analizado en todos los apartados anteriores, y centrándonos sobre todo en las cargas espectrales y en los errores residuales aparte de las validaciones de los modelos, podemos concluir que el modelo válido es el de 5 componentes.

En el proceso de identificación de los componentes se ha descubierto que el componente 5 es también parte del componente 2, lo que ha ocurrido es que al realizarle las distintas correcciones se ha generado un solapamiento de los datos, por lo tanto, esas intensidades de fluorescencia corresponden al componente 2 y no a un nuevo componente.

En conclusión, obtendríamos un modelo válido de 4 componentes ([Figura LXXV](#)).

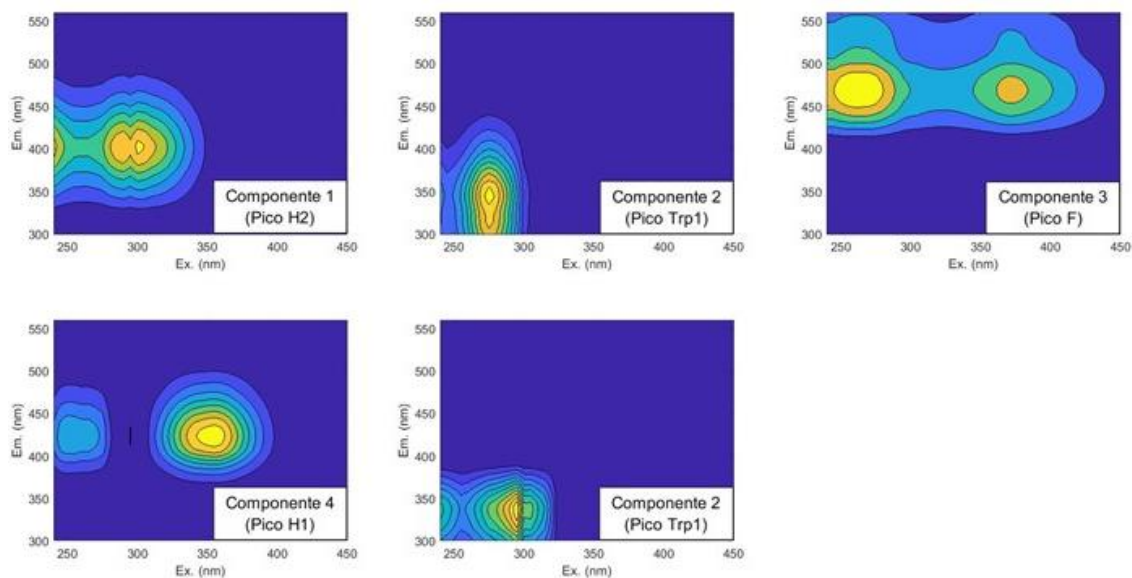


Figura LXXV Gráfico de “huellas dactilares” de 5 componentes para la EDAR Guadalete.